

**TRANSPORTMESSUNGEN AN VESIKELN AUS DER KERNHÜLLE
(NUCLEAR ENVELOPE) VON RATTENLEBERZELLKERNEN**

*Norbert Riedel
Diss. Frankfurt a/Main
1983*

Digitized by the Internet Archive
in 2026

**TRANSPORTMESSUNGEN AN VESIKELN AUS DER KERNHÜLLE
(NUCLEAR ENVELOPE) VON RATTENLEBERZELLKERNEN**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften**

**vorgelegt
beim Fachbereich Biochemie, Pharmazie
und Lebensmittelchemie der
Johann Wolfgang Goethe Universität
zu Frankfurt am Main**

**von
Norbert Riedel
aus Bremervörde**

**Frankfurt am Main
1983**

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Biochemie,
Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität
Frankfurt am Main.

Dekan: Prof. Dr. Dr. E. Mutschler

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. H. Fasold

Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. H. Rüterjans

Tag der Promotion: 19. Dezember 1983

Für Ursula

Herrn Prof. Dr. Dr. H. Fasold gilt mein besonderer Dank für die Stellung des Themas und für die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Dr. H. Fischer von der Bundesanstalt für Sera und Impfstoffe danke ich für das Anfertigen der elektronenmikroskopischen Präparate und für die Hilfe bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Herrn Dr. R. Valentin danke ich für das mir zur Verfügung gestellte ATP-Analogon S-(Dinitrophenyl)-6-Merkapto-Purin-ribosid-Triphosphat (TPA).

Herrn M. Bachmann gilt mein Dank für die Unterstützung bei der Präparation der Ribonukleinsäuren und den damit verbundenen Messungen.

Bei allen Kollegen am Institut für Biochemie bedanke ich mich für ihre ständige Hilfsbereitschaft, für die vielfältigen Diskussionen und Anregungen und für das gute Arbeitsklima.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
2.	ERGEBNISSE	
2.1.	Darstellung von Zellkernen aus Rattenleber	13
2.2.	Darstellung der " nuclear envelopes " (NEs)	15
2.2.1.	Bestimmung des DNA-Gehaltes der NEs	16
2.2.2.	Zusammensetzung der Heparin-NEs und der DNase-NEs im Vergleich zu ganzen Zellkernen	17
2.2.3.	Versuche zur Subfraktionierung der Heparin- NEs	20
2.3.	Nachweis des vesikulären Charakters der Heparin-NEs	24
2.3.1.	Untersuchung einer NE-ATPase mit S-(Dinitro- phenyl)-6-Merkapto-Purinribosid-Triphosphat (TPA)	24
2.3.1.1.	Bestimmung einer Kern- bzw. NE-ATPase- Aktivität	24
2.3.1.2.	Versuche zur Solubilisierung der ATPase mittels nichtionischem Detergens und hohen Salzkonzentrationen (high salt wash)	25
2.3.1.3.	Untersuchung der Permeabilität des NE gegen- über TPA	26
2.3.1.4.	Wirkung von TPA auf die ATPase	28
2.3.1.5.	Versuche zum Einschluß von TPA in NE-Vesikel (bisher Heparin-NEs) und Lokalisation der ATPase	30
2.3.2.	Untersuchung der NE-Vesikel mittels Ferritin	31
2.3.2.1.	Permeabilität von Ferritin gegenüber NEs	31
2.3.2.2.	Versuche zum Einschluß von Ferritin in NE- Vesikel und Vergleich mit DNase-NEs; Stabi- lität der Vesikel	33
2.3.3.	Elektronenmikroskopische Darstellung von NE-Vesikeln	35
2.3.3.1.	Darstellung im Transmissions-Elektronen- mikroskop (TEM)	35

2.3.3.2.	Darstellung im Raster-Elektronenmikroskop (REM)	36
2.3.3.3.	Messung der Eisenverteilung in NE-Vesikeln in einem REM-Präparat	37
2.4.	Bestimmung des Volumens von Zellkernen und NE-Vesikeln	39
2.5.	Transportmessungen an NE-Vesikeln	40
2.5.1.	Diskussion verschiedener Methoden zur Durchführung von Transportmessungen	40
2.5.2.	Messungen mit radioaktiv markierten Histonen an Zellkernen und NE-Vesikeln	42
2.5.2.1.	Präparation von Histonen aus Kalbsthymus	44
2.5.2.2.	Messung der Adsorption von Histonen an die Membranen von Zellkernen und NE-Vesikeln	45
2.5.2.3.	Kinetik der Histonaufnahme in NE-Vesikel	47
2.5.2.4.	Kinetik des Histoneffluxes aus NE-Vesikeln	50
2.5.2.5.	Messung des Heparin-Gehaltes von NE-Vesikeln	52
2.5.2.6.	Histonaufnahme in NE-Vesikel nach Behandlung mit DNase I	53
2.5.2.7.	Histonaufnahme in NE-Vesikel nach Vorinkubation mit steigenden Mengen an nicht markierten Histonen; Sättigung der Histonaufnahme	55
2.5.3.	Messungen mit HMG-Proteinen (high-mobility-group Proteine) und sauren chromosomalen Proteinen an NE-Vesikeln	58
2.5.3.1.	Präparation von HMG-Proteinen und sauren chromosomalen Proteinen	60
2.5.3.2.	Kinetik der Aufnahme von HMG-Proteinen und sauren chromosomalen Proteinen in NE-Vesikel	61
2.5.3.3.	Aufnahme von HMG-Proteinen in NE-Vesikel nach Vorinkubation mit Histonen	63
2.5.4.	Messung der Aufnahme von Nicht-Kernproteinen in NE-Vesikel	66
2.6.	Einfluß von verschiedenen Ribonukleinsäuren auf die ATPase der NE-Vesikel; Messung des Effluxes der Ribonukleinsäuren aus den NE-Vesikeln	69

2.6.1.	Effekt von Poly(A) auf die ATPase-Aktivität von NE-Vesikeln und DNase-NEs	70
2.6.2.	Untersuchungen an NE-Vesikeln und DNase-NEs mit verschiedenen Ribonukleinsäuren	73
2.6.2.1.	Präparation und Jodierung der verschiedenen Ribonukleinsäuren	73
2.6.2.2.	Effekt von Hefe-RNA, rRNP, rRNA und mRNA auf die ATPase-Aktivität von NE-Vesikeln und DNase-NEs	76
2.6.2.3.	Inkubation von Zellkernen und NE-Vesikeln mit radioaktiv markierter Hefe-RNA und mRNA	79
2.6.2.4.	Messung des Effluxes von Hefe-RNA, rRNA und mRNA nach dem Einschluß in die NE-Vesikel	80
3.	DISKUSSION	85
4.	ZUSAMMENFASSUNG	92
5.	EXPERIMENTELLER TEIL	
5.1.	Darstellung der Zellkerne	93
5.1.1.	Kontrolle der Präparation der Zellkerne im Lichtmikroskop	94
5.2.	Darstellung von NEs	94
5.2.1.	Darstellung von NEs mittels DNase I	94
5.2.2.	Darstellung von NE-Vesikeln mittels Heparin	95
5.2.3.	Bestimmung des DNA-Gehaltes der NEs	95
5.2.4.	Subfraktionierung der NE-Vesikel	96
5.3.	Untersuchung einer NE-ATPase mit S-(Dinitrophenyl)-6-Merkapto-Purinribosid-Triphosphat (TPA)	97
5.3.1.	ATPase-Aktivitätsmessungen	97
5.3.2.	Inkubation der Kerne bzw. NE-Vesikel mit TPA	98
5.3.3.	Einschluß von TPA und Ferritin in NE-Vesikel	98
5.3.3.1.	Einschluß von TPA	98
5.3.3.2.	Einschluß von Ferritin	99
5.3.3.3.	Bestimmung des Phosphatgehaltes der NEs	99
5.4.	Untersuchungen im Elektronenmikroskop	100
5.4.1.	Untersuchungen im TEM	100

5.4.2.	Untersuchungen im REM	101
5.5.	Bestimmung des Volumens von Zellkernen und NE-Vesikeln	101
5.6.	Transportmessungen mit Proteinen an Zell- kernen und NE-Vesikeln	103
5.6.1.	Transportmessungen mittels Zentrifugal- filtration	103
5.6.2.	Präparation von Histonen	104
5.6.3.	Vorinkubation der NE-Vesikel mit nicht radioaktiven Histonen; Sättigung der His- tonaufnahme	105
5.6.4.	Präparation von HMG-Proteinen	106
5.6.5.	Präparation von sauren chromosomalen Pro- teinen	108
5.7.	PAA-Gelelektrophoresen	109
5.8.	Einfluß verschiedener RNAs auf die ATPase- Aktivität von NE-Vesikeln und DNase-Nes; Messung des Effluxes der RNAs aus den NE- Vesikeln	110
5.8.1.	Präparation und Jodierung der verschiedenen RNAs	110
5.8.2.	ATPase-Aktivitätstests in Anwesenheit von RNAs	112
5.8.3.	Inkubation von Zellkernen und NE-Vesikeln mit radioaktiv markierter Hefe-RNA und mRNA	113
5.8.4.	Einschluß von Hefe-RNA, rRNA und mRNA in NE-Vesikel	113
6.	LITERATURVERZEICHNIS	115

ABKÜRZUNGEN

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA (" copy-DNA ")
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
cpm	Counts pro Minute
CTP	Cytidintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DNase-NEs	mittels DNase präparierte NEs
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
g	Erdbeschleunigungskonstante (9.8 m/sec^2)
GDP	Guanosindiphosphat
GMP	Guanosinmonophosphat
gr	Gramm
GTP	Guanosintriphosphat
Heparin-NEs	mittels Heparin präparierte NEs
HMG-Proteine	" high-mobility-group "-Proteine
hnRNA	heterogene nukleare RNA
keV	Kiloelektronvolt
M	molar
mA	Milliampere
mCi	Millicurie
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
Min.	Minute
mol	Mol
mRNA	messenger RNA
µg	Mikrogramm
µmol	Mikromol
N	normal
NE	" nuclear envelope " = Kernhülle
nm	Nanometer
OD _{A260}	Optische Dichte bei 260 nm
PAA	Polyacrylamid

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCL	Porenkomplex-Lamina
PCLF	PCL-Fraktion
Poly(A)	Poly-Adenylsäure
Poly(dA)	Poly-Desoxyadenylsäure
Poly(dT)	Poly-Desoxythymidylsäure
Poly(G)	Poly-Guanylsäure
Poly(U)	Poly-Uridylsäure
REM	Raster-Elektronenmikroskop
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonukleoprotein
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
rRNP	ribosomales RNP
S	Svedbergkonstante
SDS	Natriumdodecylsulfat
snRNA	kleine nukleare RNA
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskop
TPA	S-(Dinitrophenyl)-6-Merkapto-Purin- ribosid-Triphosphat
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan

Danach setzt sich der NE aus einer Anzahl verschiedener Komponenten zusammen, die im folgenden kurz beschrieben werden sollen:

Die innere und die äußere, Ribosomen tragende Kernmembran sind durch den 15-30 nm breiten perinuklearen Raum (2) voneinander getrennt, wobei die äußere Kernmembran in das Endoplasmatische Retikulum übergeht. Dennoch sind die beiden Membransysteme in ihrem Proteinmuster und in ihrer Proteinanordnung voneinander verschieden (3,4). Verbindungen zwischen zytoplasmatischen Elementen und dem NE sind häufig. Man findet Mikrotubuli parallel zum NE, manchmal mit seitlichen Verbrückungen zur äußeren Kernmembran oder direkt in ihr verankert. Aktin-Filamente und Intermediär-Filamente sind mit dem NE assoziiert. Die postulierten Funktionen dieser Verknüpfungen reichen von einer Verankerung des Zellkerns in der Zelle über einen Einfluß auf die Form des Zellkerns bis zu einer Teilnahme an den Bewegungen des Zellkerns (5-7).

Die innere Kernmembran ist mit der dem Nukleoplasma zugewandten Seite fest mit der " fibrous lamina " assoziiert. Die fibrous lamina (8) bzw. lamina (9) ist eine im Elektronenmikroskop als dichte Schicht zu erkennende, zwischen der inneren Kernmembran und dem peripheren Chromatin liegende Struktur, die in einer Vielzahl von Eukaryonten vorkommt (10). Arbeiten über die Charakterisierung der Lamina wurden an Rattenleber (1,11), Vogel-Erythrozyten (12-15) und Xenopus-Oozyten (16) durchgeführt. Danach besteht sie hauptsächlich aus drei Polypeptiden der Molekulargewichte 69 000, 67 000 und 62 000, die man als Lamin A, B und C bezeichnet. Durch isoelektrische Fokussierung in zweidimensionaler Gelelektrophorese konnte gezeigt werden, daß Lamin A aus vier und Lamin C aus drei Untertypen besteht, wogegen Lamin B nur eine Bande bildet (17). Allerdings gilt dies offenbar nur für Säugergewebe, denn z.B. in Hühnerzellkernen konnte gezeigt werden, daß Lamin B aus den Untertypen B₁ und B₂ besteht (10). Kernmembranen von Oozyten weisen überhaupt nur ein Lamin-Protein auf (16,18). Die Lamins enthalten Sulf-

hydroxylgruppen, die zur Ausbildung von homotypischen Oligomeren führen (19,20). Die Oligomere kommen auch im intakten NE vor und sind offenbar für die Stabilität der Kernperipherie verantwortlich. Mit immunologischen und anderen Methoden konnte gezeigt werden, daß die Lamins ausschließlich in der Peripherie des Interphasekerns lokalisiert sind und keine Strukturelemente der internen Kernmatrix (s.u.) darstellen (1,21). Mit dem Einleiten der Mitose wird die Lamina reversibel abgebaut. Die einzelnen Lamins sind dann in monomerer Form im gesamten Zytoplasma verteilt. Die Depolymerisation erfolgt möglicherweise durch enzymatische Modifizierung, denn alle Lamins sind als Monomere stark phosphoryliert (22). Während der Telophase repolymerisieren die Lamins dann bei der Neubildung des NE (23). Neben ihrer strukturellen Funktion ist die Lamina an der Assoziation von peripherem Chromatin beteiligt (1,5,24-28).

Das periphere Chromatin erscheint stark kondensiert, stäbchenförmig und besteht aus Untereinheiten, die größer sind als ein Nukleosom. Es enthält hochrepetitive und mäßig repetitive DNA-Sequenzen (5). Die Bindung an den NE ist auf die zwischen den Porenkomplexen liegenden Bereiche beschränkt (5,27). Die Assoziation mit der Kernperipherie hat eine Funktion beim Aufbau und der Erhaltung der räumlichen Organisation der Chromosomen und vielleicht auch bei der Regulation der DNA-Replikation (24). Daneben ist sie bei der Neubildung des NE in der Telophase wichtig, wo Elemente des sich reformierenden NE mit den Oberflächen der Chromosomen wechselwirken (27,29-31). Die Bindung zwischen dem NE und dem peripheren Chromatin ist sehr fest und die DNA kann auch durch Behandlung mit Desoxyribonuklease I nicht völlig abgedaut werden. Sie ist resistent gegen Detergentien und hohe Salzkonzentrationen. Der genaue Charakter der Bindung ist bis heute nicht bekannt, möglicherweise sind daran jedoch auch Membranlipoproteine beteiligt (24).

Im Gegensatz zum NE, der definitionsgemäß aus der Doppelmembran, der peripheren Lamina und den Porenkomplexen besteht, bezeichnet man als Kernmatrix das Proteingerüst im Kern-

inneren (32). Die isolierte Kernmatrix ist resistent gegenüber Detergentien und Puffern hoher Ionenstärke. Durch Behandlung mit DNase, RNase und Triton X-100 ist sie fast frei von DNA, RNA und Phospholipiden (32,33). Ob man bei der Subfraktionierung von Zellkernen den NE oder die Kernmatrix erhält, hängt sehr empfindlich von der Präparationsmethode ab (33). Ein großer Teil dieser Matrix besteht aus 2-3 nm großen Proteinfibrillen, die man Matrixin genannt hat (34). Die Fibrillen können zu 10-30 nm großen Fibrillen aggregieren und sind aus drei Hauptproteinen mit Molekulargewichten von 65 000 bis 68 000 aufgebaut (34). Im Zellkern ist die DNA mit der Matrix assoziiert, die Chromosomen nehmen dabei wahrscheinlich bedingt durch die Matrixstrukturen eine ganz bestimmte Raumstruktur ein (34). Durch eine modifizierte Methode zur Darstellung der Kernmatrix (35) kann man eine DNA-reiche Matrix isolieren. Aus Untersuchungen daran wurde abgeleitet, daß im Zellkern etwa 0.1 % der Matrixproteine an der Bindung von DNA beteiligt sind, die etwa 125 000 Bindungsstellen zur Matrix pro Zellkern hat. An dieser Assoziation sind möglicherweise Histone beteiligt (35). Die DNA bildet mit Histonen zunächst die Grundeinheit, das Nukleosom (36,37). Die nächste Überstruktur ist eine Chromatinfaser mit einem Durchmesser von 25-30 nm, die ebenfalls schraubenförmig aufgewickelt ist und als Solenoid bezeichnet wird (37). Diese Struktur, für ein Chromosom immer noch etwa 100 Mal zu groß, muß nun wieder eine Überstruktur bilden. Dies sind die "supercoiled loops", die etwa 10^5 Basenpaare umfassen (38-40) und durch RNA und Proteine in ihrer Struktur stabilisiert werden. Ein Zellkern enthält etwa 20 000 bis 50 000 dieser "supercoiled loops". Beide Enden eines "supercoiled loop" werden dann durch die Matrix fixiert.

Eine Vielzahl von Untersuchungen zeigt, daß die Kernmatrix an der DNA-Replikation beteiligt ist (41-45). So findet man eine Assoziation der DNA-Polymerase α mit der Matrix (46,47) und es konnte gezeigt werden, daß die Matrix als in vitro-System DNA an matrixassoziierte DNA-Fragmente synthetisiert (47). Es wird angenommen, daß der an die Matrix gebundene Replikationskomplex fixiert ist und die DNA während der

Replikation durch diesen Komplex " hindurchläuft ", möglicherweise ist es aber auch umgekehrt (" fixed matrix model " bzw. " sliding matrix model " (44)). Auf jeden Fall ist die Assoziation mit der Matrix nicht statisch, sondern sehr dynamisch. Für die Bindung an die Matrix ist keine spezifische Sequenz auf der DNA vorhanden (48,49), es können jedoch bestimmte Sequenzen gehäuft auftreten (48,50). Auch an der Transkription ist die Kernmatrix offenbar direkt beteiligt. So konnte man zeigen, daß in Hühner-Oviduktzellen das Ovalbumin-Gen bevorzugt mit der Matrix assoziiert ist, in Hühner-Leberzellen hingegen nicht (51). Hinzu kommen funktionelle Zusammenhänge zwischen der Reifung (processing) von hnRNA und der Kernmatrix (52-57).

Die Porenkomplexe sind charakteristische Strukturen des NE. Ihre Häufigkeit ist von Zelltyp zu Zelltyp und innerhalb eines Zelltyps verschieden. Dies hängt offenbar vor allem vom physiologischen Zustand ab. Der Aufbau und die Zusammensetzung der Porenkomplexe sind bis heute nicht vollständig bekannt. Das liegt besonders daran, daß bis heute keine Isolierungsmethoden entwickelt werden konnten, mit denen man die Porenkomplexe völlig rein darstellen kann. NEs aus Amphibien-Oozyten sind zur Anreicherung von Porenkomplexen besonders geeignet, da sie eine ungewöhnlich hohe Anzahl an Porenkomplexen enthalten (16,58). Elektronenmikroskopisch erscheint der Porenkomplex als ein Zylinder, der den NE durchspannt und eine oktagonale Symmetrie um eine zentrale Achse senkrecht zur Membranebene aufweist. Der Porenkomplex setzt sich aus der eigentlichen Pore und dem mit ihr in regelmäßiger Ultrastruktur assoziierten Material, dem Ring und dem Zentralkörper zusammen. Je acht globuläre Untereinheiten (Durchmesser ca. 22 nm) bilden einen äußeren, d.h. dem Zytoplasma zugewandten und einen inneren, d.h. dem Nukleoplasma zugewandten Ring um die Pore. Der Zentralkörper hat einen Durchmesser von etwa 35 nm und sitzt im Zentrum der Pore. Das Vorhandensein dieses Zentralkörpers scheint von der Art des gewählten Präparates und innerhalb eines Präparates von der Stoffwechselaktivität des Kerns abhängig zu sein (59). Hinzu kommen acht sogenannte Speichen, Strukturen

die radial vom Zentralkörper zur Peripherie reichen und mit den Ringen verbunden sind. Der Porenkomplex, der einen äußeren Durchmesser von etwa 120 nm aufweist (58,60), kann betrachtet werden als dreilagiges " Sandwich " aus einer Scheibe (Speichen und Zentralkörper) zwischen dem äußeren und dem inneren Ring (60). Jeder Ring ist koplanar zu einer Hälfte der Doppelmembran, der Porenkomplex hat somit zwei gleiche, aber gegenüber liegende Hälften. Damit kommt zu der oktagonalen Symmetrie noch eine Symmetrie mit der Achse in der Membranebene. Die dem Zytoplasma zugewandte Hälfte ist manchmal mit großen Partikeln, in Aussehen und Größe Ribosomen ähnlich, dekoriert (58). Das nicht membranöse Poren-

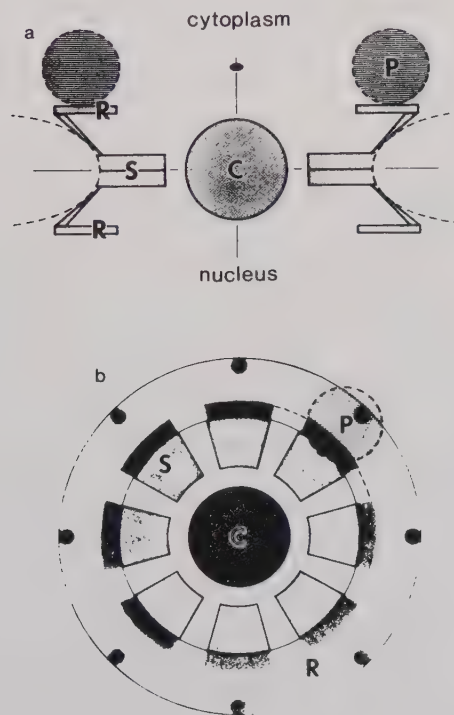


Abb.2 Schematische Darstellung der Porenkomplexe nach Unwin und Milligan (58). C = Zentralkörper, S = Speichen , R = Ringe, P = Partikel, die Ribosomen ähneln.

komplexmaterial besteht vorwiegend aus Polypeptiden höheren Molekulargewichtes (59). Wie Untersuchungen an porenkomplex-

reichen Fraktionen aus Amphibien-Oozyten gezeigt haben (16), machen zwei Proteine vom MG 73 000 und 150 000 einen hohen Anteil dieser Fraktion aus. Ein Protein mit MG 68 000 konnte immunologisch als zum Porenkomplex gehörend identifiziert werden (61). In Rattenleber wurde ein Glykoprotein mit dem MG 190 000 als porenkomplexspezifisch identifiziert (62).

Frühe Untersuchungen mit kolloidalem Gold zeigten, daß dieses nach Mikroinjektion in Amöben durch die Porenkomplexe in den Kern aufgenommen wurde. Durch Verwendung von Goldpartikeln verschiedenen Durchmessers wurde gezeigt, daß die obere Grenze für eine Passage durch den NE bei 12.5-14.5 nm liegt (63). Vergleichbare Ergebnisse wurden an Oozyten unter Verwendung von Ferritin (64), jodierten Proteinen (65) und mit ³H-Dextranen verschiedenen Durchmessers (66) gefunden. Der Radius der Pore liegt nach diesen Messungen bei 4.5 nm (66) und stimmt mit den meisten der verfügbaren Daten über Permeabilitätsmessungen überein.

Da der NE das Nukleoplasma vom Zytoplasma trennt, diese aber in einem ständigen Stoffaustausch sind, stellt sich die Frage, welche Bedeutung dem NE bei nukleozytoplasmatischen Transportvorgängen zukommt. Der Transport von Metaboliten und Coenzymen ist notwendig, weil sie an Reaktionen beteiligt sind, die sich auf den Kern bzw. das Zytoplasma beschränken. So benötigt z.B. der Kern Nukleotide als Vorstufen der DNA- und RNA-Synthese. Ionen und kleine Moleküle bewegen sich sehr schnell zwischen Kern und Zytoplasma (29), der NE stellt hierfür keine Barriere dar (67,68) und der Prozeß verläuft als einfache Diffusion. Dennoch können Konzentrationsgradienten auftreten, die dann auf einer Bindung an intranukleare Komponenten beruhen (69). Versuche von Gurdon (70) zeigten, daß Proteine nach Mikroinjektion ins Zytoplasma in den Kern aufgenommen und dort u.U. beträchtlich akkumuliert werden. Für verschiedene Proteine wie Myoglobin, γ -Globulin, Ovalbumin, Rinderserumalbumin usw. stellte man fest, daß ihre Größe ein entscheidender Parameter für die Aufnahme in den Zellkern ist (65). Kleine Proteine wie ribosomale Proteine gelangen unabhängig von ihrer Ladung rasch in den Zellkern und werden

dort angereichert (71). Große Proteine, deren Durchmesser im Bereich des Durchmessers der Poren liegen, benötigen Stunden, um in meßbaren Konzentrationen in den Kern zu gelangen. Dabei beruht die schlechte Aufnahme dieser Proteine nicht etwa auf einer hohen Affinität zu Komponenten des Zytoplasmas (64). Der Transport einiger großer Polypeptide in den Zellkern verläuft allerdings unter Vermittlung der Porenkomplexe, was man dadurch zeigen kann, daß die Aufnahme etwa 20 Mal schneller verläuft, als durch reine Diffusionsprozesse erklärbar wäre (72). Für Nukleoplasmin, ein Pentamer mit dem MG 165 000, konnte gezeigt werden, daß eine Region des Monomers mit MG 12 000 für den selektiven Transport in den Kern notwendig ist (73). Da man u.a. für die kerntypischen Proteine N1-N⁴ zeigen konnte, daß der zytoplasmatische Vorläufer und das im Kern akkumulierte Protein identisch sind, muß die Signalsequenz, die das Protein in den Kern dirigiert, im Translationsprodukt enthalten sein (74). Mit Versuchen an verschiedenen Zellsystemen konnte gezeigt werden, daß Proteine des Kerns auch nach Reinjektion in eine Wirtszelle wieder im Kern akkumulieren (für N1-N⁴ ist die Anreicherung mehr als 120-fach im Vergleich zum Zytoplasma), daß es Proteine gibt, die spezifisch für das Zytoplasma sind und nicht in den Kern gelangen und wieder andere, die sich gleichmäßig zwischen Kern und Zytoplasma verteilen (75-79). Einige Polypeptide scheinen zwischen Kern und Zytoplasma pendeln zu können (shuttling nuclear proteins) und sind dabei am nukleozytoplasmatischen Transfer von RNA beteiligt bzw. wirken als zytoplasmatische Regulatoren von Kernaktivitäten (80-82). Auch diese Ergebnisse schließen aus, daß die Aufnahme von Proteinen in den Kern nach dem Muster abläuft wie der kotranslationale Transport von sekretorischen Proteinen ins Lumen des endoplasmatischen Retikulums (83), denn die extrahierten Kernproteine sind nach der Injektion ins Zytoplasma zum Wiedereintritt in den Empfänger-Kern fähig. Außerdem werden große Proteine auch noch Stunden nach einer Blockade der Proteinbiosynthese mit Puromycin in den Kern aufgenommen, was zeigt, daß Synthese und Translokation nicht gekoppelt sind (84).

Messungen mit verschiedenen, radioaktiv markierten Proteinen zeigten, daß diese im Zellkern angereichert werden. Eine solche Anreicherung kann z.B. durch Absorption oder kovalente Bindung an Kernstrukturkomponenten ermöglicht werden (85-87). Für den Durchtritt durch den NE wäre dann wieder eine einfache Diffusion ausreichend. Für eine untergeordnete Funktion des NE als Barriere sprechen auch Ergebnisse, nach denen der Kern auch dann noch weitgehend alle Kernproteine zurückbehält, wenn man den NE mit Glasnadeln punktiert und undicht macht (88).

Die im Zytoplasma benötigten RNAs, wie z.B. mRNA und rRNA, werden im Zellkern zunächst als große Vorstufen synthetisiert (hnRNA) und nach der Reifung als funktionelle RNP-Partikel ins Zytoplasma abgegeben. Daneben gibt es RNAs niedrigen Molekulargewichtes, die sich in beiden Richtungen zwischen Zellkern und Zytoplasma bewegen. Dies sind 4-10 S RNAs mit 65-200 Nukleotiden (89,90). Ihre Funktion ist bisher nicht genau bekannt, wahrscheinlich spielen sie eine Rolle bei der Regulation der Genaktivität (91).

Die rRNA wird zunächst im Nukleolus als 45 S-Vorstufe synthetisiert, mit Proteinen assoziiert und dann in die kleineren rRNP-Moleküle gespalten. Es wird angenommen, daß die rRNPs den NE als Partikel durchqueren, die bereits so groß sind wie die Untereinheiten des Ribosoms, also etwa 23 nm im Durchmesser für die 60 S-Untereinheit und etwa 23 x 12-14 nm für die 40 S-Untereinheit (71,92).

Die Transkription von mRNA führt zuerst zu einer hnRNA. Posttranskriptionale Modifikationen sind dann die Veränderung des 5'-Endes (cap formation, (93)) und die Polyadenylierung am 3'-Ende der hnRNA (94). Der Poly(A)-Teil der mRNA wird dann mit Proteinen assoziiert, wobei ein Poly(A)-RNP-Komplex entsteht (95). Durch Heraußschneiden von intervenierenden Sequenzen wird das Transkript dann zum reifen mRNP-Komplex. Sowohl rRNP- als auch mRNP-Partikel können die Pore nicht per Diffusion durchdringen, da sie größer sind als der für die Pore angegebene Durchmesser von 9 nm (96). Es gilt heute als gesichert, daß der Transport ins Zytoplasma energieabhängig ist.

Tatsächlich findet man im NE ATPase-Aktivität. Da es bis heute noch nicht gelungen ist, dieses Enzym zu solubilisieren und zu reinigen, sind keine vollständigen Angaben über seine Eigenschaften möglich. Das Enzym ist fest mit dem NE assoziiert (97-100), jedoch ist seine genaue Lokalisation nicht bekannt. Während einige Arbeitsgruppen die ATPase in den Porenkomplexen gefunden haben (101,102), wurde sie von anderen Arbeitsgruppen auch bzw. nur in anderen Regionen des Zellkerns identifiziert (100,103,104). Da man sowohl die ATPase-Aktivität als auch den RNA-Transport mit Antikörpern gegen Lamin B hemmen kann, ist u.U. Lamin B nicht nur eine Strukturkomponente der Lamina, sondern ebenfalls die für den Transport verantwortliche ATPase (105). Wahrscheinlich gibt es mehrere ATPasen. Das Enzym ist von zweiwertigen Kationen wie Mg^{2+} abhängig (99,100) und zeigt eine breite Substratspezifität (99). Das Molekulargewicht ist nicht genau bekannt. Mit Hilfe eines in der α -Position ^{32}P -markierten ATP-Analogen konnte gezeigt werden, daß in Rattenleber-NEs zwei Polypeptide mit MG 47 000 und MG 100 000 spezifisch markierbar sind. Beide Polypeptide könnten deshalb Bestandteile der ATPase sein (106). Im Gegensatz dazu wurde mit α - ^{32}P -ATP ein Polypeptid mit MG 174 000 bevorzugt markiert (107).

Die ATPase ist durch RNA und synthetische Polynukleotide stimulierbar (98,108), wobei Poly(A) das Enzym am besten stimuliert. Eine Vielzahl von Untersuchungen an isolierten Zellkernen zeigt, daß die Freigabe von mRNA ATP-abhängig ist (109-111). Dies gilt jedoch nicht für den mRNA-Transport aus bestimmten Tumorzellen (109,112) und für den Transport von rRNP-Partikeln (113,114). Die ATPase ist offenbar nur an dem nukleozytoplasmatischen Transport von mRNA beteiligt und der Poly(A)-Teil der mRNA dabei die entscheidende Erkennungssequenz (108,115,116). Die genauere Charakterisierung des Transportvorganges zeigt, daß die Fluidität der Kernmembranen in höheren Eukaryonten keinen Einfluß hat (117) und der Transport auch nach Entfernung oder Beschädigung der Kernmembranen nicht verschlechtert wird (112,118). Der Transport ist temperaturabhängig (119-121), kann in Ratten durch Gabe von Tryptophan erhöht werden (122) und ist durch Proteinfaktoren

des Zytoplasmas stimulierbar (109), die offenbar als mRNA-Transportproteine fungieren (123). Der NE hat Bindungsstellen für Insulin (124) und nach Bindung von Insulin kann sowohl die ATPase-Aktivität (125) als auch bevorzugt der mRNA-Transport (126) stimuliert werden. Dagegen bewirkt die Bindung von Colchicin an die Porenkomplex-Lamina-Fraktion (127) eine Hemmung des RNA-Transports (127,128), u.z. durch eine Veränderung der Porenkomplexe.

Während der Prokaryont seine Proteinbiosynthese fast nur über die Transkription, d.h. die Menge an gebildeter mRNA reguliert, kommen beim Eukaryonten noch posttranskriptionale Regulationsmechanismen der Genexpression hinzu. Dies sind besonders die Vorgänge der Reifung der mRNA und des Transports durch die Porenkomplexe, die offenbar von einem nukleozytoplasmatischen Rückkopplungssystem mitreguliert werden (116,123). Den Komponenten des Zellkerns und vor allem dem NE kommen bei dieser Regulation große Bedeutung zu. Während in sehr vielen Untersuchungen die Ultrastruktur der Kernkomponenten erforscht wurde, sind Arbeiten über Transportphänomene, abgesehen von denen, die sich mit dem Efflux von mRNA befassen, erst seit jüngerer Zeit bekannt geworden.

Eine Methode zur Darstellung von geschlossenen und richtig orientierten Vesikeln aus NEs von Rattenleberzellkernen wurde erarbeitet. Dabei war zunächst wichtig, mit verschiedenen Untersuchungen nachzuweisen, daß die Vesikel frei von Kerninhaltsstoffen, stabil und vor allem dicht sind, aber die Komponenten der Kernperipherie noch enthalten. Diese Vesikel erwiesen sich als gut geeignetes Modellsystem, um Transportmessungen damit durchzuführen. Nachdem gezeigt war, daß die Vesikel nur zu kerntypischen Proteinen, wie z.B. Histonen, eine hohe Affinität haben, wurde versucht, den Transport und auch die Bindungseigenschaften von Histonen genauer zu untersuchen. Dabei zeigte sich eine sehr rasche Aufnahme und starke Akkumulation von Histonen, wie dies auch für isolierte Zellkerne gezeigt werden kann. Mit der Präparation der Vesikel ging eine Anreicherung der NE-ATPase

einher, die deutlich als auf der Innenseite der Vesikel lokalisiertes Enzym nachgewiesen wurde. Um den Zusammenhang zwischen der ATPase und dem Transport von RNAs auch an den Vesikeln zu zeigen, wurden RNAs isoliert und versucht, diese in die Vesikel einzuschließen. Der Efflux von mRNA war dabei deutlich durch ATP stimulierbar, womit erstmals eine direkte Korrelation zwischen ATPase und Transport von mRNA in einer Subfraktion der Zellkerne (Vesikel) nachgewiesen wurde, die sich somit auch als Modellsystem für diese regulierten Prozesse als geeignet erwiesen.

2. ERGEBNISSE

2.1. Darstellung von Zellkernen aus Rattenleber

Zur Darstellung von Zellkernen gibt es mehrere Methoden. Die hier verwendete Methode ist eine Modifizierung der Vorschrift von Blobel und Potter (129). Dabei wird die Leber homogenisiert und das Homogenat in einem Saccharosedichtegradienten aufgetrennt. Dies führt zur Abtrennung der zytoplasmatischen Organellen, insbesondere des in Kontinuität mit der äußeren Kernmembran stehenden endoplasmatischen Retikulums. Die Dichte der Saccharoselösung ist so gewählt, daß die Zellkerne unter Einwirkung der Zentrifugalkraft pelletiert werden, Mitochondrien und ER aber nach oben wandern. Die der Kernmembran direkt anhaftenden ER-Membranen werden dabei durch die Scherwirkung abgetrennt.

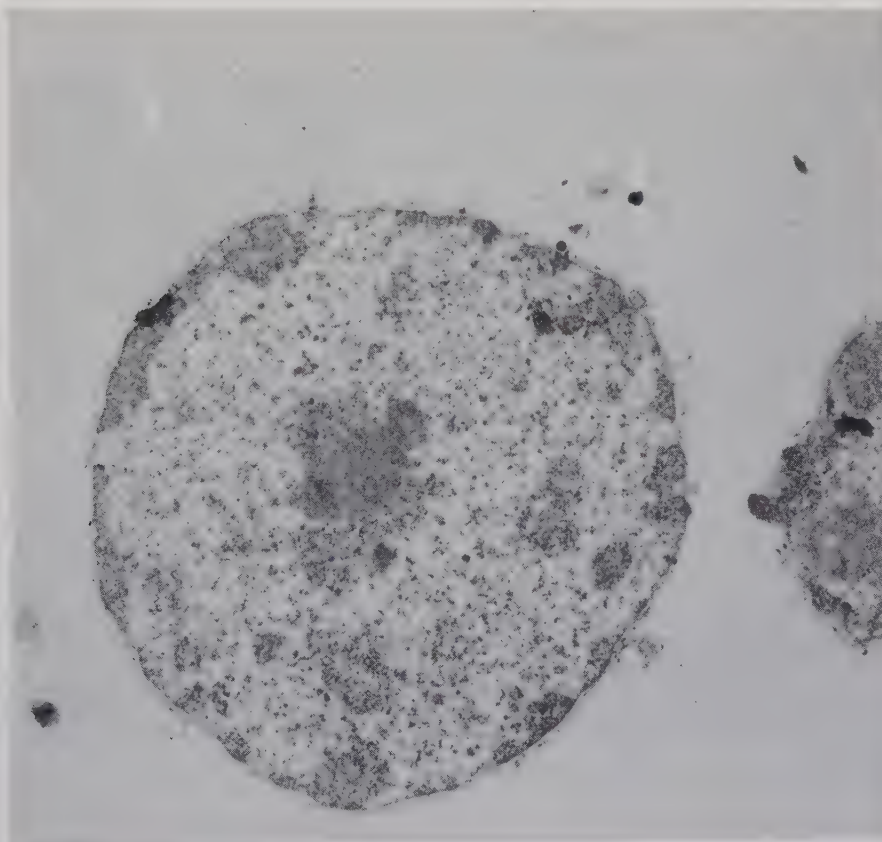


Abb.3 Darstellung von Zellkernen im Transmissions-
Elektronenmikroskop bei 10 600-facher Vergrößerung

Bei der Untersuchung so dargestellter Zellkerne im Elektronenmikroskop erkennt man, daß die Zellkerne morphologisch sehr gut erhalten sind. Es sind kaum beschädigte oder zerstörte Zellkerne zu finden. Chromatin, innere Kernmembran und Porenkomplexe sind identisch mit den entsprechenden Strukturen in intakten Leberzellen, durch Abtrennung der ER-Membranen fehlen allerdings etwa 15% der äußeren Kernmembran. Die Kernsuspension ist fast frei von zytoplasmatischen Verunreinigungen (siehe Abb. 3 und 4). Ein weiterer Vorteil dieser Präparationsmethode liegt neben der Einfachheit und Reinheit in der hohen Ausbeute an Zellkernen.

Isolierte Zellkerne sind nicht nur morphologisch gut erhalten, sondern zeigen daneben eine Vielzahl von Fähigkeiten der Zellkerne in intakten Geweben. Dazu gehören z.B. DNA-Synthese (130, 131), Transkription (132-135), Reifung und Transport von RNA (109-111,136) und viele Enzymaktivitäten.

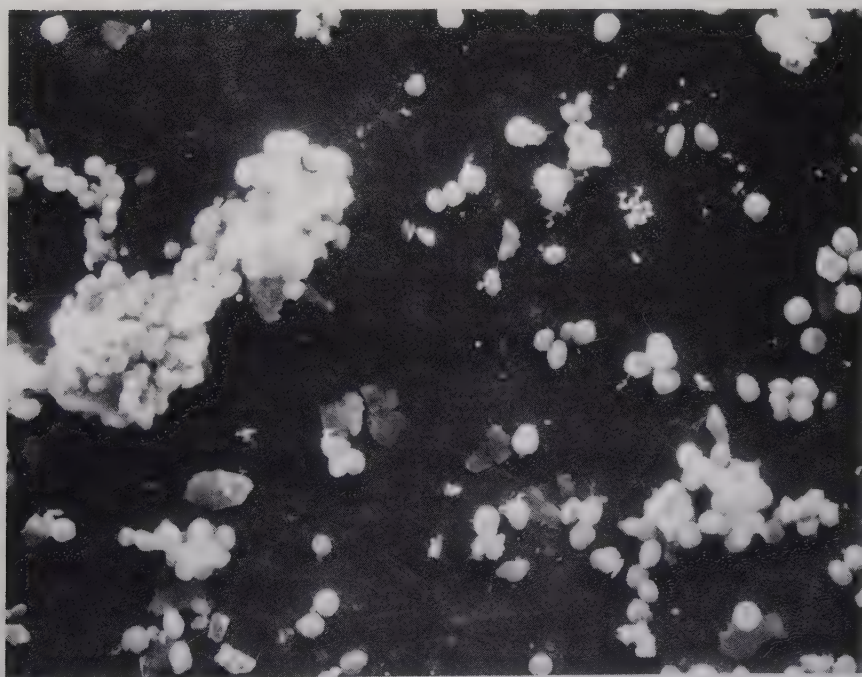


Abb.4a) Darstellung von Zellkernen im Raster-Elektronenmikroskop bei 600-facher Vergrößerung zum Nachweis der Reinheit der Kernfraktion

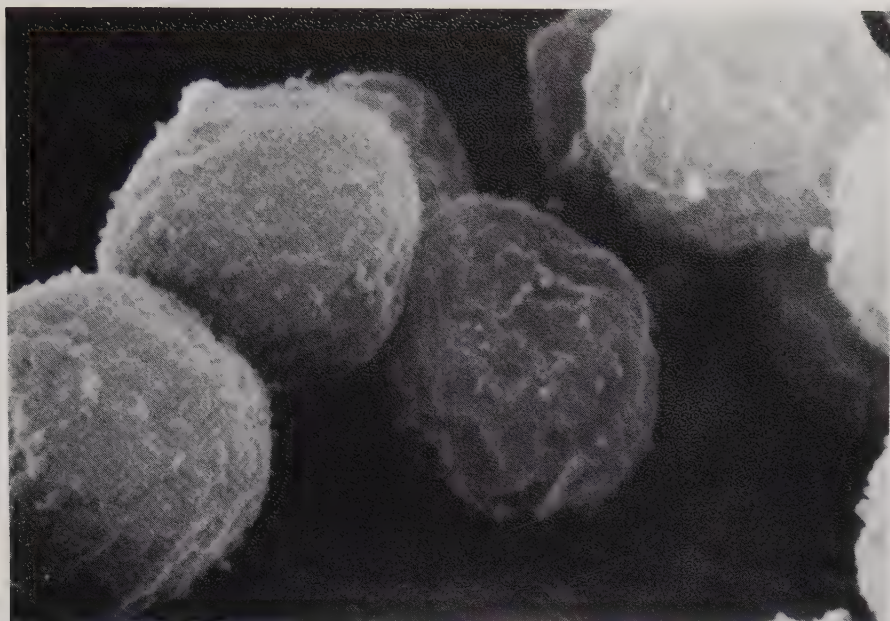


Abb.4b) Darstellung von Zellkernen im Raster-Elektronenmikroskop bei 5 600-facher Vergrößerung zum Nachweis der morphologischen Unversehrtheit

2.2. Darstellung der " nuclear envelopes " (NEs)

Auch zur Darstellung von NEs gibt es mehrere Methoden. Dazu gehören

- Zerstörung der Kerne durch eine kombinierte NaHCO_3 - und DNase I-Behandlung (138)
- Inkubation der Kerne in hypotonem Medium und bei geringer Ionenstärke in Gegenwart von DNase I (139)
- Zerstörung der Kerne in hypotonem Medium in Gegenwart von Heparin (140).

Der Nachteil der Behandlung mit hohen Ionenkonzentrationen liegt darin, daß dabei u.U. erhebliche Mengen Membranproteine herausgelöst werden (141). Die in dieser Arbeit zu vergleichenden Untersuchungen verwendeten NEs wurden nach der Methode von Dwyer und Blobel (142) präpariert, die eine Optimierung der Vorschrift von Kay et al. (139) ist. Sie liefert weit-

gehend offene NEs (143).

Die von Bornens und Courvalin (140) entwickelte Methode wurde hier modifiziert angewendet. Bei einem bestimmten Verhältnis zwischen dem DNA-Gehalt der Kerne und Heparin kommt es zur völligen Solubilisierung der inneren Kernstrukturen und man erhält reine NEs mit einem sehr geringen Rückstand an DNA und Histonen. Die NEs bestehen aus der inneren und der äußeren Kernmembran, enthalten Kernporen und die für die Lamina typischen Polypeptide. Im Überstand findet man das gesamte Heparin in Form von Protein-Heparin-Komplexen. Der Mechanismus der Chromatin-Solubilisierung durch Heparin besteht vermutlich darin, daß es als Polyanion Chromatin von seinen spezifischen Bindungsstellen zum NE verdrängt (144).

2.2.1. Bestimmung des DNA-Gehaltes der NEs

Ein wichtiges Kriterium beim Vergleich von Heparin-NEs und DNase-NEs ist der Gehalt an DNA. Die Lamina, die mit der inneren Kernmembran verbunden ist, ist mit Chromatin assoziiert (1,5,24-28). Während bei der Darstellung der NEs mittels DNase-Behandlung die DNA enzymatisch entfernt wird, beruht der Mechanismus bei der Behandlung mit Heparin vermutlich auf einer Verdrängung der DNA.

Die Bestimmung des DNA-Gehaltes erfolgte modifiziert nach Burton (145). Diese Methode ist selbst eine Abwandlung der DNA-Bestimmung nach Dische (146) und zeichnet sich vor allem dadurch aus, daß sie etwa viermal empfindlicher und weniger störanfällig ist. So hat z.B. Saccharose bei dieser Messung keinen Einfluß, was besonders wichtig war, da die gemessenen Proben in Saccharosepuffern vorlagen.

Bei der Bestimmung des DNA-Gehaltes wird zunächst durch eine Inkubation der Probe in Perchlorsäure sämtliche RNA entfernt. Darauf folgt eine zweimalige DNA-Extraktion mit Perchlorsäure bei 70°C, wobei etwa 95% der DNA extrahiert wird. Durch Zugabe von Diphenylamin kommt es zur Bildung eines Farbkompleses, dessen Extinktion dem DNA-Gehalt proportional ist. Zur Eichung wird eine Stammlösung aus Kalbsthymus-DNA in Perchlorsäure verwendet.

Fraktion	$\mu\text{g DNA}$ mg Protein	DNA-Gehalt in % bezogen auf den Proteingehalt
Heparin-NEs	20.47	2.04
DNase-NEs	34.27	3.42

Tab.1 DNA-Gehalt von Heparin-NEs und DNase-NEs.

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte nach Lowry (147). Die Werte sind Mittelwerte aus 3 Messungen.

Wie die Tabelle 1 zeigt, liegt der DNA-Gehalt der Heparin-NEs deutlich unter dem der DNase-NEs. Die Werte entsprechen den in der Literatur veröffentlichten Angaben über den Restgehalt an DNA in NE-Präparationen.

2.2.2. Zusammensetzung der Heparin-NEs und der DNase-NEs im Vergleich zu ganzen Zellkernen

Bei einem Vergleich der mittels Heparin bzw. DNase I dargestellten NEs ist neben den morphologischen Betrachtungen von entscheidender Bedeutung, ob und wie sich beide Präparate in der Polypeptidzusammensetzung unterscheiden. Die Polypeptide der Porenkomplex-Lamina-Fraktion (PCL) sind gegenüber allen bisher verwendeten Subfraktionierungs- und Solubilisierungsversuchen resistent (142). Man sollte deshalb erwarten, daß sich die verschiedenen NE-Fractionen und die Zellkerne in dieser Hinsicht in ihrem Polypeptidmuster nicht unterscheiden.

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) ist eine Methode zur Trennung und Identifizierung von Proteinen. Hierbei löst man die zu untersuchende Probe zunächst in einer 1%-igen Lösung des Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS), welches die meisten Protein-Protein- und Protein-Lipid-Wechselwirkungen unterbindet. Anschließend wird das Gemisch auf ein

SDS-enthaltendes Acrylamidgel geschichtet und darin einige Stunden einem elektrischen Feld ausgesetzt. In solchen Gelen hängt die elektrophoretische Beweglichkeit vieler Proteine von ihrem Molekulargewicht ab. Ohne SDS wäre die Nettoladung des Proteins auch von Bedeutung, sie unterliegt hier aber der wesentlich stärkeren Ladung von SDS, an das das Protein gebunden ist. Färbt man nach dem Lauf das Gel mit Coomassie blue an, so werden die aufgetrennten Polypeptide sichtbar. Läßt man Vergleichsproteine bekannten Molekulargewichtes mitlaufen, so kann man aus der Entfernung vom Auftragspunkt auf das Molekulargewicht eines jeden Polypeptides schließen. Mit der PAGE sind selbst Proteinmengen im Mikrogrammbereich erkennbar.

Wie die Abbildung 5 zeigt, sind die Heparin-NEs und die DNase-NEs in ihrem Polypeptidmuster ähnlich. Die für die PCL-Fraktion typischen Hauptpolypeptide mit MG 62 000, 67 000 und 69 000 (17) sowie eine Vielzahl von Polypeptiden mit Molekulargewichten oberhalb 44 000 sind zu erkennen. Im Vergleich zu den ganzen Kernen ist das Polypeptidmuster viel weniger komplex und der Histonanteil viel geringer. Dabei muß man berücksichtigen, daß man in der eindimensionalen PAGE nur nach Molekulargewichten auf-trennt, so daß eine Bande im Gel durchaus aus mehreren ver-schiedenen Polypeptiden mit dem gleichen Molekulargewicht be-stehen kann. Zu jeder Fraktion wurden auch die Kern- bzw. NE-Pellets dargestellt, die man nach Inkubation mit Triton X-100 erhält. Triton X-100 ist ein nichtionisches Detergens, das die Membranen der Kerne bzw. NEs ablöst. Wahrscheinlich werden da-bei die INM und die ONM entfernt (11,18,112). Ob noch Teile der inneren Kernmembran erhalten bleiben, ist elektronenmikro-skopisch nur sehr schwierig zu charakterisieren, da die Grenz-fläche zwischen der Lamina und der inneren Kernmembran nicht erkennbar ist. Die Morphologie der Zellkerne bleibt auch nach Detergens-Behandlung erhalten, was deutlich darauf hinweist, daß die Stabilität der Kernperipherie durch die periphere Lamina gewährleistet wird. Nach Triton X-100-Behandlung sind einige Polypeptide, insbesondere im Bereich von MG 50 000-55 000, teil-weise aus den Fraktionen entfernt (schwächere Banden). Die Polypeptide der PCL-Fraktion bleiben erwartungsgemäß unbeein-trächtigt.

a b c d e f g h i k l m n o

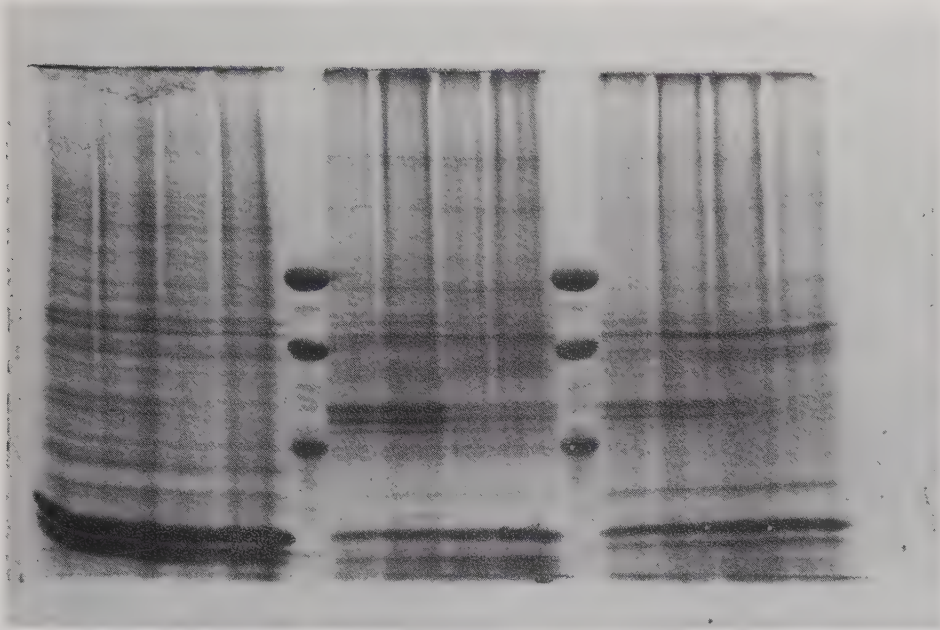


Abb.5 10% Plattengel von ganzen Zellkernen, Heparin-NEs und DNase-NEs

a = 100 μ g, b = 200 μ g ganze Zellkerne,
c = 100 μ g, d = 200 μ g ganze Zellkerne nach Inkubation
mit 1% Triton X-100,
f = 100 μ g, g = 200 μ g Heparin-NEs,
h = 100 μ g, i = 200 μ g Heparin-NEs nach Inkubation
mit 1% Triton X-100,
l = 100 μ g, m = 200 μ g DNase-NEs,
n = 100 μ g, o = 200 μ g DNase-NEs nach Inkubation
mit 1% Triton X-100,
e, k = Molekulargewichtstandards: Phosphorylase b
MG 97 400, Rinderserumalbumin MG 68 800,
Ovalbumin MG 44 600.

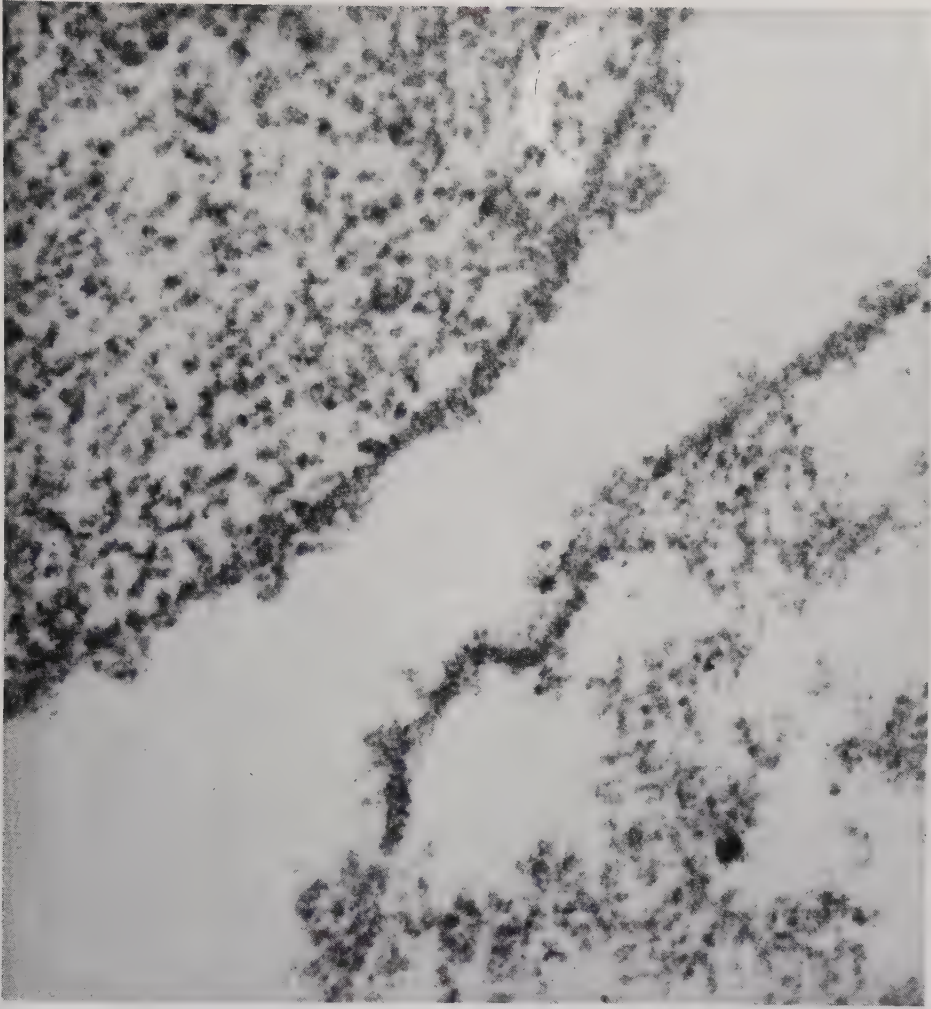


Abb.6 Peripherie von Zellkernen im Transmissions-Elektronenmikroskop bei 86 000-facher Vergrößerung nach Entfernung der Kernmembranen mit Triton X-100. Die Lamina, die dem Zellkern seine Stabilität gibt, ist deutlich zu erkennen.

2.2.3. Versuche zur Subfraktionierung der Heparin-NES

Wie unter 2.2.2. gezeigt wurde, haben die Heparin-NES ein recht umfangreiches Muster an Polypeptidbanden. Es sollte deshalb versucht werden, über die Behandlung mit Triton X-100 hinaus, eine weitere Subfraktionierung der NES zu erreichen. Hierbei wurde in Analogie zu den Arbeiten an DNase-NES (4,142) verfahren. Das Subfraktionierungsschema zeigt, daß an die Detergens-Behandlung ein sogenannter " salt wash " (142)

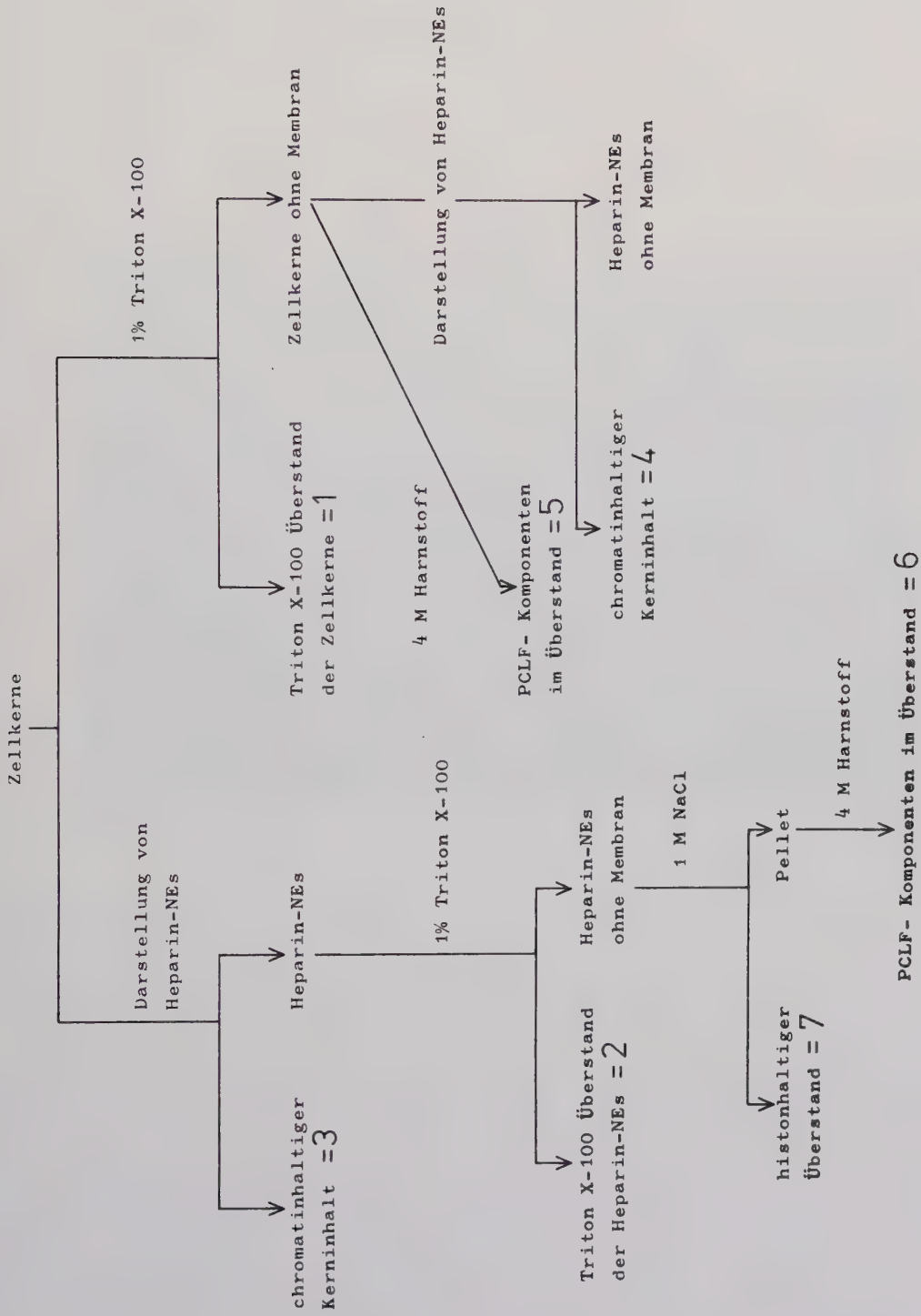


Abb.7 Schema zur Subfraktionierung von Zellkernen und Heparin-NEs

und eine Inkubation mit 4 M Harnstoff (4) anschließen. Die Inkubation mit NaCl sollte dabei vor allem Histone, die mit Harnstoff vor allem Komponenten der Porenkomplexe extrahieren (148).

Sämtliche Fraktionen wurden dialysiert, lyophilisiert, in Elektrophoresepuffer aufgenommen und mittels PAGE untersucht. Das Ergebnis zeigt Abbildung 8:

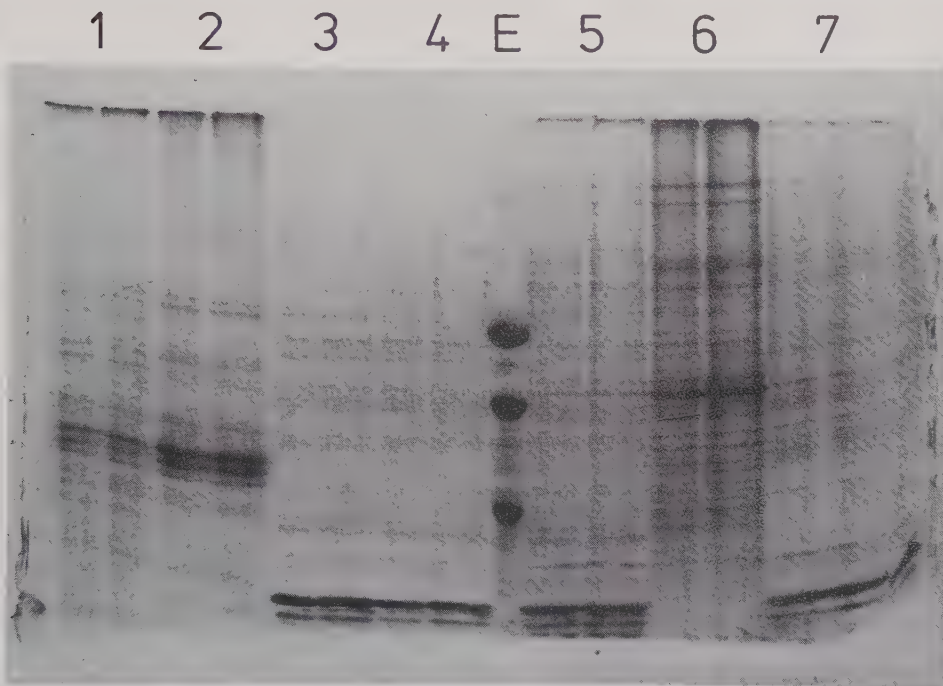


Abb.8 10% Plattengel der nach dem Schema in Abb.7 dargestellten Subfraktionen.

Von jeder Subfraktion wurden 100 μ g bzw. 200 μ g aufgetragen.

E = Molekulargewichtstandards wie in Abb.5

Die Polypeptidbanden der ganzen Zellkerne und der Heparin-NES vor und nach der Inkubation mit Triton X-100 sind bereits in Abbildung 5 (s. 2.2.2.) dargestellt worden.

1, 2: Die mit Triton X-100 solubilisierten Polypeptide im Bereich von MG 50 000-55 000 erscheinen als deutliches Banden-Triplett im Triton X-100-Solubilisat der Kerne

sowie der Heparin-NEs. Hinzu kommen einige Banden im Bereich höheren Molekulargewichtes, wobei das Polypeptidmuster der Membranen von Kernen und Heparin-NEs kaum zu unterscheiden ist.

- 3, 4: Nach der Öffnung der Kerne in hypotonem Puffer und Behandlung mit Heparin werden sämtliche Kerninhaltsstoffe solubilisiert. Das Polypeptidmuster dieser Fraktion ist demnach erwartungsgemäß komplex. Es findet sich auch kein Unterschied, wenn man die Heparininkubation mit Kernen durchführt, denen vorher mittels Triton X-100 die Membranen abgeschält wurden. Besonders auffällig an beiden Fraktionen sind die sehr starken Banden im Bereich der Histone und das Fehlen von deutlichen Banden der PCL-Fraktion.
- 5, 6: In diesen beiden Fraktionen sollte untersucht werden, ob man mit 4 M Harnstoff typische Komponenten der PCL-Fraktion aus Heparin-NEs extrahieren kann (148). Als Vergleich wurden Kerne direkt mit 4 M Harnstoff inkubiert, weil hier die PCL-Komponenten sicher noch vorhanden sind. Worauf es besonders ankommt, sind die Banden im Bereich von MG 70 000. Es zeigten sich ganz deutlich Komponenten der PCL-Fraktion neben einer Reihe anderer Polypeptide. Das umfangreiche Bandenmuster beruht darauf, daß die hier gewählte Harnstoffkonzentration so hoch war, daß nicht mehr nur Komponenten der Porenkomplexe selektiv extrahiert wurden, sondern auch der Lamina-Fraktion ($\rightarrow$ PCLF, (148)). Die Inkubation von Heparin-NEs mit 1 M NaCl führte zur völligen Entfernung der noch vorhandenen Histone, die dann als Hauptkomponenten des NaCl-Überstandes erschienen (vergleiche 6 und 7).

Die Fraktion 6 kann als biochemischer Nachweis für das Vorhandensein einer PCL-Fraktion in den Heparin-NEs angesehen werden.

2.3. Nachweis des vesikulären Charakters der Heparin-NEs

Erste elektronenmikroskopische Untersuchungen der Heparin-NEs zeigten (s.u.), daß es sich um geschlossene NEs handelt. Die typischen Polypeptide der PCL-Fraktion konnten mittels PAGE nachgewiesen werden. Die im folgenden dargestellten Versuche dienten dem Nachweis, daß die Heparin-NEs im Vergleich zu NEs, die mittels DNase-Inkubation dargestellt wurden, geschlossene Vesikel bilden. Sehr deutliche Hinweise darauf wurden bei der Untersuchung einer NE-ATPase gefunden.

2.3.1. Untersuchung einer NE-ATPase mit S-(Dinitrophenyl)-6-Merkapto-Purinribosid-Triphosphat (TPA)

2.3.1.1. Bestimmung einer Kern- bzw. NE-ATPase-Aktivität

In NEs findet man ATPase-Aktivität. Die ATPase ist durch Mg^{2+} -Ionen stimulierbar, während Na^{+} - und K^{+} -Ionen keinen Einfluß auf das Enzym haben. Die in der Literatur angegebenen spezifischen Aktivitäten der ATPase schwanken beträchtlich. Das hängt vor allem von der verwendeten Methode zur Präparation der NEs ab. Außerdem erhält man innerhalb einer Präparationsmethode durch Variation der Konzentration an Zellkernen NEs, die sich in ihrem Gehalt an DNA, Proteinen, Phospholipiden sowie in ihrer Dichte unterscheiden. Diese Unterschiede beeinträchtigen die Aktivität der ATPase (149). Das Alter der verwendeten Ratten spielt ebenfalls eine Rolle. Um die gemessenen Aktivitäten vergleichen zu können, wurden deshalb stets Ratten gleichen Gewichtes und gleiche Testbedingungen verwendet.

Die gemessenen Aktivitäten liegen bei $22 \times 10^{-3} \mu\text{mol } P_i \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{Min.}^{-1}$ für Zellkerne, bei $84 \times 10^{-3} \mu\text{mol } P_i \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{Min.}^{-1}$ für Heparin-NEs und $49 \times 10^{-3} \mu\text{mol } P_i \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{Min.}^{-1}$ für DNase-NEs

und stellen Mittelwerte aus fünf Messungen dar.

Wie zu erkennen ist, ist die Aktivität in den NEs beträchtlich

angereichert. Die Aktivitäten liegen, wenn man mit Tabelle 2 vergleicht, im Bereich der in der Literatur veröffentlichten Werte.

Kerne	NEs	NE / Kern	Literaturstelle
18	29	1.6	Kashnig & Kasper (1969)
21	87	4.0	Kartenbeck et al.(1970)
14	53	3.6	Sikstrom et al.(1976)
22	93	4.2	Franke et al.(1970)

Tab.2 ATPase-Aktivitäten von Zellkernen und NEs in $\mu\text{mol P}_i \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{Min.}^{-1} \times 10^{-3}$. NE/Kern = Anreicherung bei der Isolierung der NEs aus den Zellkernen. Die Tabelle ist ein Ausschnitt aus (25).

2.3.1.2. Versuche zur Solubilisierung der ATPase mittels nichtionischem Detergens und hohen Salzkonzentrationen (high salt wash)

Wie die ATPase-Aktivitätsmessungen zeigen, ist das Enzym in den Heparin-NEs beträchtlich angereichert. Es sollte deshalb versucht werden, das Enzym weiter anzureichern. Dazu wäre es vorteilhaft, wenn man das Enzym aus dem NE solubilisieren könnte, ohne daß es dabei seine Aktivität verliert.

Zur Solubilisierung von Membranproteinen gibt es mehrere Möglichkeiten. So kann man mit nichtionischen Detergentien die Membran zerstören (129) oder mit hohen Salzkonzentrationen in Anwesenheit von Detergens solche Proteine aus der Membran herauslösen, die sowohl ionische als auch hydro-

phobe Interaktionen benötigen (141).

Als nichtionisches Detergens wurde Triton X-100 gewählt. Für die Versuche zur Solubilisierung wurden zunächst Heparin-NEs dargestellt. Diese wurden dann in einem kleinen Volumen Puffer rehomogenisiert und mit Triton X-100 1%-ig gemacht. Die Suspension wurde zehn Minuten im Eisbad inkubiert. Nach der Zentrifugation wurden ein Überstand (HTs) und ein Pellet (HTp) erhalten, die beide auf ihre ATPase-Aktivität getestet wurden.

Die gemessenen Aktivitäten liegen bei

$34 \times 10^{-3} \mu\text{mol P}_i \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{Min.}^{-1}$ für HTs und bei

$7 \times 10^{-3} \mu\text{mol P}_i \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{Min.}^{-1}$ für HTp und stellen Mittelwerte aus drei Messungen dar.

Es konnte zwar ein beträchtlicher Anteil der ATPase solubilisiert werden, eine Anreicherung gegenüber den Heparin-NEs war jedoch nicht möglich.

Der Anteil an solubilisierten Proteinen nimmt zu, wenn man die Membranen neben Triton X-100 zusätzlich mit hohen Salzkonzentrationen behandelt (141). Deshalb wurden die Heparin-NEs in einem Puffer rehomogenisiert, der 1% Triton X-100 und eine MgCl_2 -Konzentration von 0.5 M enthielt. Auch hier wurden HTs und HTp wieder einem ATPase-Aktivitätstest unterzogen. In beiden Fällen war keine ATPase-Aktivität nachweisbar, obwohl doppelt soviel Proteine aus der Membran herausgelöst wurden wie mit der einfachen Triton X-100-Solubilisation. Da bekannt ist, daß die ATPase durch hohe Ionenkonzentrationen hemmbar ist (99), wurden die Fraktionen zur Entfernung von MgCl_2 dialysiert und erneut gemessen. Auch nach der Dialyse war jedoch keine Aktivität des Enzyms nachweisbar. Eine Anreicherung der ATPase-Aktivität war somit auch durch diese Versuche nicht möglich.

2.3.1.3. Untersuchung der Permeabilität des NE gegenüber TPA

TPA ist ein Triphosphat-Analogon, welches unter Abspaltung von Dinitrothiophenol kovalent an die ATPase bindet und damit das Enzym inaktiviert. Aufgrund des Molekulargewichtes

von TPA würde man erwarten, daß es den NE frei permeieren kann. Bei einem Kernporenradius von 4.5 nm (66) und einem für TPA berechneten Durchmesser von 2 nm dürfte der NE keine Barriere darstellen. Tatsächlich findet man aber nach Inkubation von ganzen Zellkernen mit radioaktiv markiertem TPA in einer Konzentration von 2×10^{-5} M und anschließender Darstellung von NEs mittels DNase-Behandlung, daß 95-98% der Radioaktivität an der Membran gebunden sind. Wie weitere Experimente zeigen, ist dies nicht etwa eine Bindung an die Innenseite der NEs nach vorherigem Transport des TPA durch den NE. TPA ist also nicht in der Lage, in intakte Zellkerne zu gelangen (4,106). Dies zeigt auch Abbildung 9:

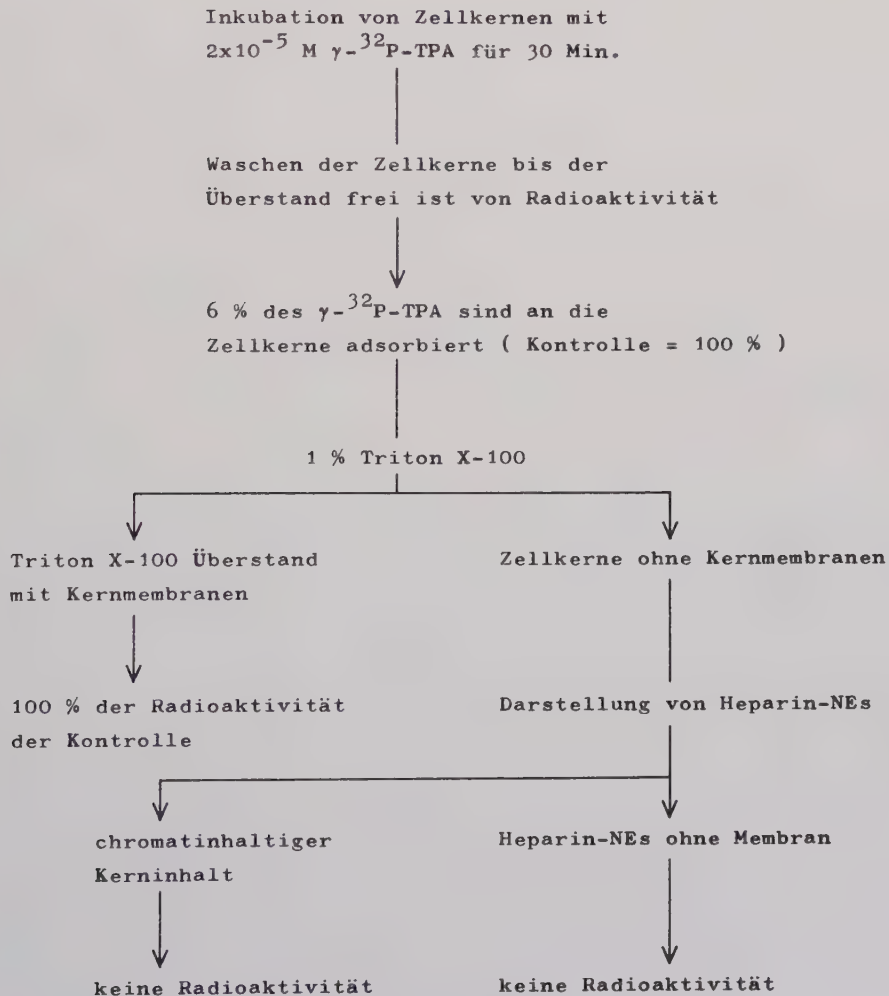


Abb.9 Inkubation von Zellkernen mit γ - 32 P-TPA zum Nachweis, daß das Triphosphat-Analogon den NE nicht zu durchdringen vermag

2.3.1.4. Wirkung von TPA auf die ATPase

Wenn TPA den NE nicht durchdringen kann, andererseits aber die NE-ATPase im Inneren der Zellkerne lokalisiert ist, so dürfte man keine Hemmung des Enzyms mit TPA feststellen können. Daneben wäre eine etwaige Hemmung der ATPase-Aktivität ein Maß für den Anteil an zerstörten oder beschädigten Kernen. Wie von Kondor-Koch (4) gezeigt werden konnte, hemmt TPA die ATPase-Aktivität in mittels DNase-Behandlung dargestellten NEs bereits in einer Konzentration von 1×10^{-6} M. Bei einer Konzentration des Inhibitors von 1×10^{-5} M im ATPase-Test nimmt die Aktivität der ATPase um etwa 50% ab.

Es sollte untersucht werden, welchen Einfluß TPA auf die ATPase-Aktivität von Heparin-NEs hat. Dazu wurden Heparin-NEs mit TPA in einer Konzentration von 2×10^{-5} M inkubiert und anschließend auf ihre ATPase-Aktivität untersucht. Eine NE-Suspension ohne Vorinkubation mit TPA sowie eine Suspension aus intakten Zellkernen mit und ohne Vorinkubation mit TPA dienten als Vergleich. In einem weiteren Versuch wurde aus den Heparin-NEs die ATPase mittels Triton X-100 solubilisiert und der Überstand HTs nach Inkubation mit 2×10^{-5} M TPA und in Abwesenheit von TPA auf seine ATPase-Aktivität getestet.

Wie die Versuche zeigten, war an den Zellkernen und an den Heparin-NEs nur eine sehr geringe Hemmung der ATPase-Aktivität nachweisbar. Das war für die Zellkerne zu erwarten und bestätigt, daß die Zellkerne fast alle intakt sind. Das Ergebnis für die Heparin-NEs zeigt eindeutig, daß es sich um eine Suspension handelt, die fast ausschließlich aus Vesikeln besteht. Würden die NEs nur zum Teil Vesikel bilden, so müßte eine Hemmung der ATPase-Aktivität zu sehen sein, wie dies für die weitgehend offenen NEs nach DNase-Behandlung von Zellkernen der Fall ist (4,106).

Das Ergebnis deutet außerdem darauf hin, daß der NE in den Vesikeln ebenso orientiert ist wie in den intakten Zellkernen, da das Enzym in beiden Fällen für den Inhibitor unzugänglich ist. Die Inkubation der mit Triton X-100 solubilisierten ATPase mit TPA führte zu einer Hemmung der Aktivität von 38%.

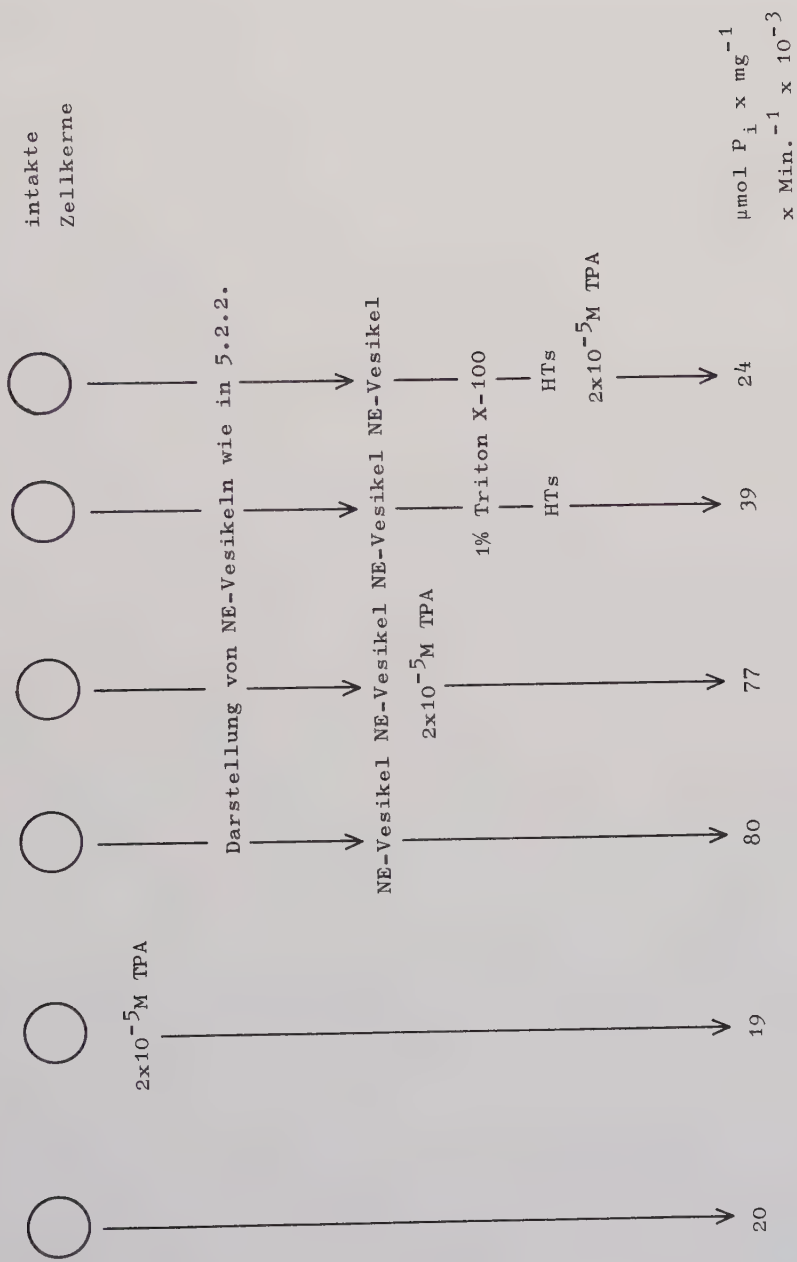


Abb.10 Schematische Darstellung der Versuche zur Wirkung von TPA auf die ATPase.
Die Werte sind Mittelwerte aus drei Versuchen.

2.3.1.5. Versuche zum Einschluß von TPA in NE-Vesikel (bisher Heparin-NEs) und Lokalisation der ATPase

Kann man TPA in die NE-Vesikel einschließen? Wenn ja, sollte man erwarten, daß die ATPase dann für den Hemmstoff zugänglich ist und inhibiert wird.

Um dies zu prüfen, wurden NE-Vesikel dargestellt. Dabei wurde der Inhibitor in einer Konzentration von 2×10^{-5} M entweder unmittelbar vor der Zugabe von Heparin zu den Zellkernen zugegeben oder aber die NE-Vesikel wurden direkt mit dem Hemmstoff inkubiert. Als Kontrolle diente wieder eine Fraktion ohne TPA. Nach der Inkubation wurden alle Fraktionen einem ATPase-Aktivitätstest unterzogen. Das Ergebnis zeigt Abbildung 11:

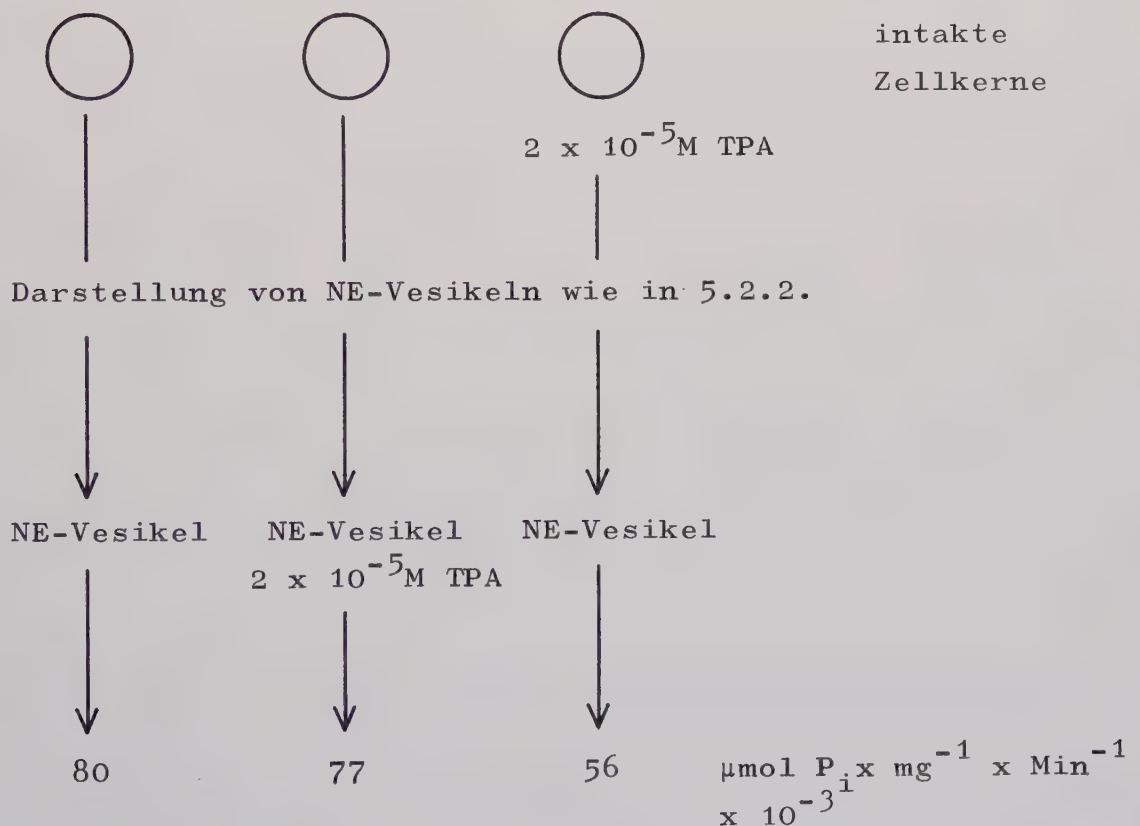


Abb. 11 Schematische Darstellung der Versuche zum Einschluß von TPA in NE-Vesikel

Es konnte eine Hemmung der ATPase demonstriert werden, wenn der Inhibitor in die Vesikel eingeschlossen wurde. Die Hemmung lag bei 30% im Vergleich zur Kontrolle. In den nachträglich mit TPA inkubierten Vesikeln entsprach die gemessene Enzymaktivität der Kontrollaktivität ohne TPA.

Damit ist gezeigt, daß der Inhibitor in die Vesikel eingeschlossen werden kann und daß er dort die ATPase hemmt. Da das Enzym " von außen " nicht hemmbar ist, muß es an der Innenseite der NEs lokalisiert sein. Dies stimmt mit Beobachtungen überein, nach denen der Inhibitor zu der Innenseite des NE eine zehnmal höhere Affinität hat als zur Außenseite (4).

Die Versuche zeigten außerdem, daß der NE in den Vesikeln genauso orientiert ist wie in den Zellkernen. Es handelt sich also bei den NE-Vesikeln um " Outside-out " -Vesikel.

2.3.2. Untersuchung der NE-Vesikel mittels Ferritin

Nachdem gezeigt werden konnte, daß TPA während der Präparation der NE-Vesikel in diese eingeschlossen werden kann, sollte untersucht werden, ob auch ein Einschluß von Ferritin in die Vesikel möglich ist. Dies wäre aus zwei Gründen sehr nützlich. Erstens könnte es zur Messung der Stabilität der Vesikel dienen, da ein Austritt aus den Vesikeln nicht durch Diffusion, sondern nur durch Platzen der Vesikel möglich wäre. Zweitens wäre Ferritin sehr hilfreich bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung der Vesikel.

2.3.2.1. Permeabilität von Ferritin gegenüber NEs

Ferritin ist ein Eisen-Speicherprotein der Milz. Die prosthetische Gruppe dieses Metallproteins ist $\text{Fe}(\text{OH})_3$. Sie kann bis zu 23 Gewichts-% des gesamten Proteins ausmachen. Ferritin hat ein MG von 465 000 und besteht aus 24 identischen Untereinheiten. Nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen handelt es sich um ein Protein mit einer Größe von

9.4 x 9.4 nm (64). Die Eisenatome des Proteins stellen Zentren hoher Elektronendichte dar. Deshalb ist Ferritin besonders für elektronenmikroskopische Untersuchungen gut geeignet.

Um Bindungsstudien an Zellkernen und NEs betreiben zu können, wurde Ferritin mit ^{14}C -Acetanhydrid acetyliert. Nach der Inkubation wurde die Proteinlösung dialysiert, um nicht gebundenes ^{14}C -Acetanhydrid zu entfernen.

Ferritin ist aufgrund seiner Größe nicht in der Lage, durch den NE von Zellkernen zu gelangen (64,66,70). Wenn man Zellkerne mit radioaktiv markiertem Ferritin inkubiert, so wird es in geringen Mengen an die Kernmembran adsorbiert. Zellkerne wurden mit ^{14}C -Ferritin inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden Aliquots entnommen, zentrifugiert und die Radioaktivität in den Pellets gemessen. Wie die Tabelle 3 zeigt, wurde dabei erwartungsgemäß keine Zunahme der Radioaktivität gefunden. Da der erste Zeitwert erst nach einer Inkubationszeit von fünf Sekunden gemessen werden konnte, muß man offenbar davon ausgehen, daß die Adsorption bereits weitgehend abgeschlossen war.

Inkubationszeit in Sekunden	Radioaktivität in cpm pro mg Protein
5	845
15	410
50	538
80	728
180	793
300	969
3 600	555
7 200	772

Tab.3 Adsorption von ^{14}C -Ferritin an Zellkerne in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Proteingehalt nach Lowry (147)

2.3.2.2. Versuche zum Einschluß von Ferritin in NE-Vesikel und Vergleich mit DNase-NES; Stabilität der Vesikel

Bei einer Inkubation von NE-Vesikeln und DNase-NES mit ^{14}C -Ferritin ist ein den Zellkernen entsprechendes Ergebnis zu erwarten. Die Heparin-NES sind auch als Vesikel nicht in der Lage, Ferritin aufzunehmen. Deshalb wird bei einem Vergleich die Adsorption an die NE-Vesikel der Adsorption an die DNase-NES entsprechen. Wenn es jedoch möglich wäre, Ferritin während der Präparation von NE-Vesikeln in diese einzuschließen, käme zu dem Adsorptionswert an die Membran noch eine best. Menge in die Vesikel aufgenommenen Ferritins hinzu und die Radioaktivität müßte gegenüber DNase-NES erhöht sein.

Zellkerne wurden mit Ferritin inkubiert und unmittelbar danach NES mittels DNase I und Heparin dargestellt.

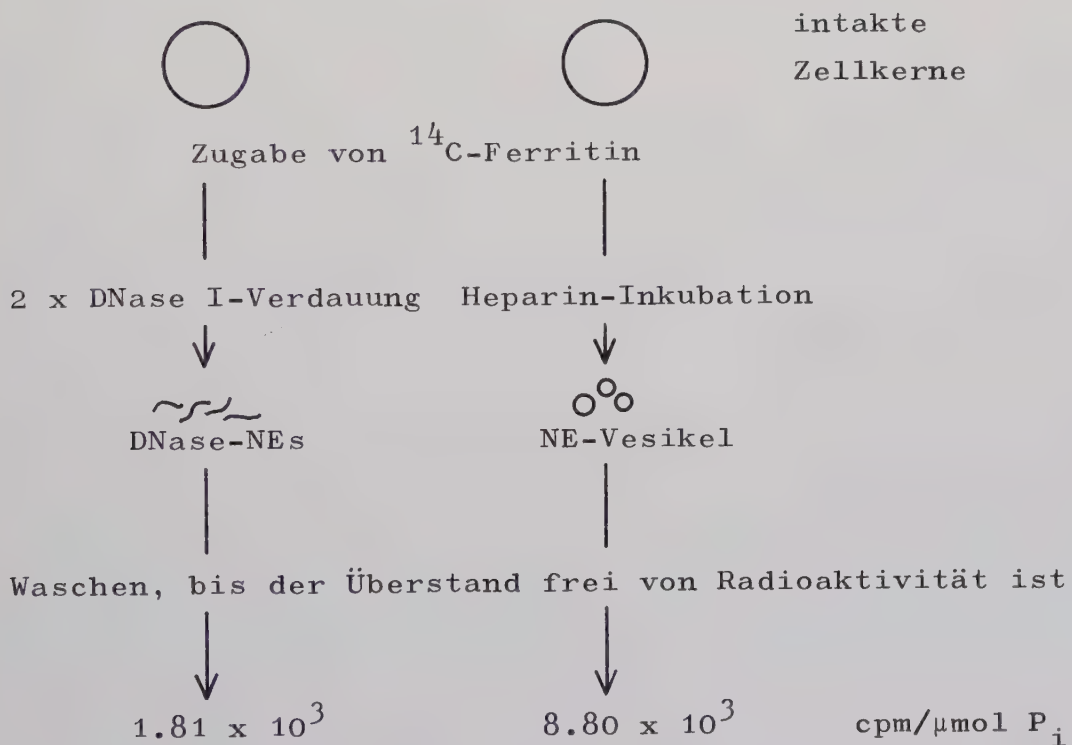


Abb.12 Schematische Darstellung der Versuche zum Einschluß von Ferritin in NE-Vesikel

Die Versuche ergaben, daß die NE-Vesikel fünfmal mehr Radioaktivität bezogen auf den Phosphatgehalt enthielten.

Die Radioaktivität der Proben wurde auf den Phosphatgehalt der NEs bezogen, weil durch die Inkubation mit Ferritin eine Proteinbestimmung nicht möglich war.

Die Bestimmung des Phosphatgehaltes erfolgte modifiziert nach Ames und Dubin (150). Eine Probe der NE-Suspension wurde in einem Platintiegel über einem Bunsenbrenner verascht. Die Asche wurde in 1 N HCl gelöst und dann der Phosphatgehalt im Phosphat-Autoanalysator nach Fiske und Subbarow (151) bestimmt.

Mit diesen Versuchen ist ebenfalls gezeigt, daß es sich bei den mit Heparin dargestellten NEs um Vesikel handelt. Da die DNase-NEs und die NE-Vesikel in ihrer Zusammensetzung sehr ähnlich sind, ist die sehr viel höhere Radioaktivität in der NE-Vesikelsuspension nur durch einen Einschluß erklärbar.

Ein Maß für die Stabilität der NE-Vesikel erhält man, wenn man aus einer Suspension, die mit radioaktiv markiertem Ferritin beladene Vesikel enthält, zu verschiedenen Zeiten Proben entnimmt und die Radioaktivität im Überstand mißt. Wenn die Radioaktivität zunimmt, kann dies nur darauf beruhen, daß Vesikel geplatzt sind, weil Ferritin nicht aus den Vesikeln diffundieren kann. Die Zunahme der Radioaktivität im Überstand ist dabei ein Maß für die Zerstörung der Vesikel.

Es wurden mit ^{14}C -Ferritin beladene NE-Vesikel präpariert. Die Suspension wurde so lange in Puffer gewaschen, bis der Überstand frei von Radioaktivität war. Dann wurde die Radioaktivität der Vesikelsuspension gemessen; sie betrug 5 000 cpm pro ml. Zu verschiedenen Zeiten wurde jeweils 1 ml Suspension entnommen und zentrifugiert, um die Vesikel abzutrennen. In einem Aliquot des Überstandes wurde die Radioaktivität bestimmt. Die Messungen zeigten, daß die Radioaktivität im Überstand der Vesikelsuspension im Verlauf von 48 Stunden nur geringfügig, d.h. um etwa 5% zunahm. Daraus muß geschlossen werden, daß die Vesikel über einem Zeitraum von zwei Tagen intakt bleiben und somit als stabil anzusehen sind.

2.3.3. Elektronenmikroskopische Darstellung von NE-Vesikeln

2.3.3.1. Darstellung im Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM)

Zur Darstellung der Vesikel im TEM wurden diese zunächst in Phosphatpuffer gewaschen und dann in einem 2.5%-igen Glutaraldehyd-Soerensen-Puffer fixiert. Um morphologische Veränderungen durch osmotische Effekte zu verhindern, hatten die verwendeten Puffer die gleiche Osmolarität wie der Puffer, in dem sich die Vesikel nach der Präparation befunden haben.

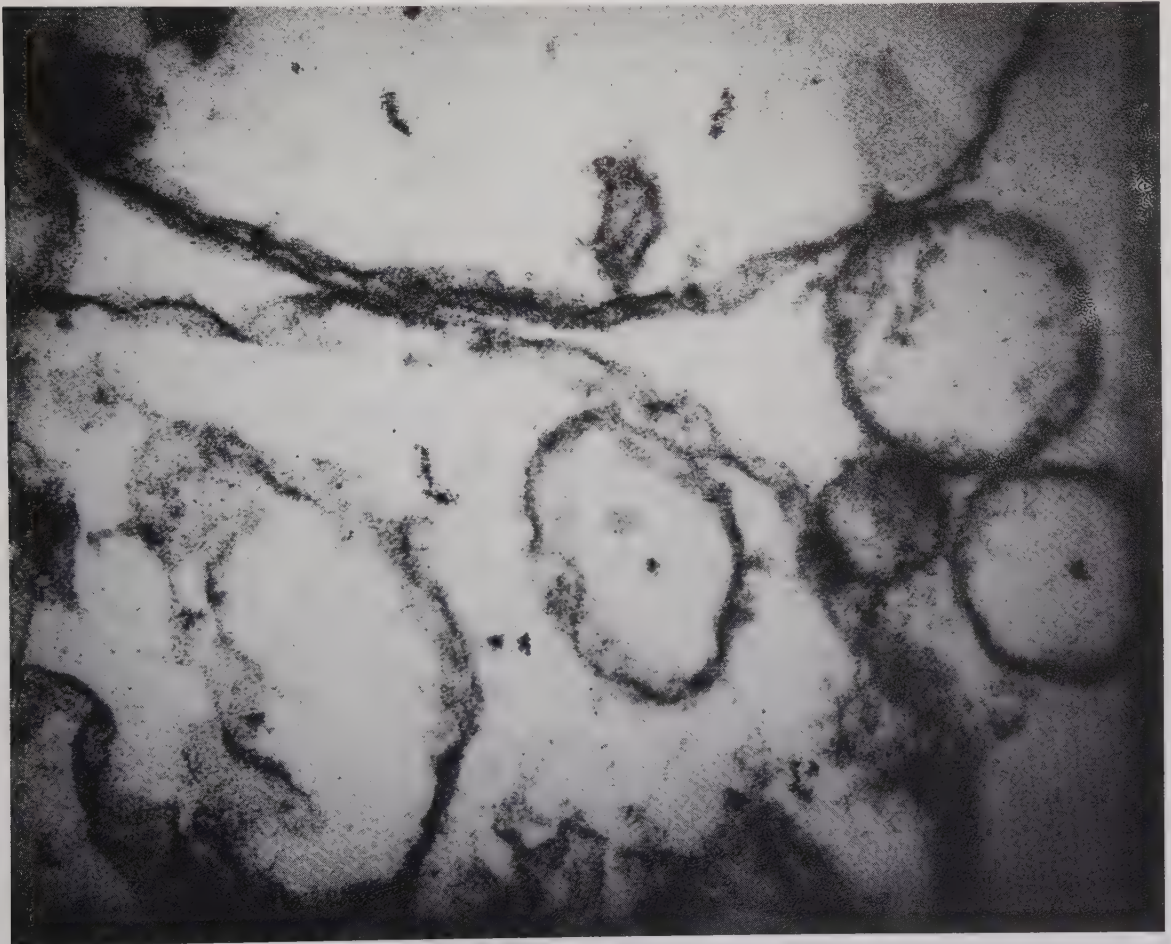


Abb.13 Darstellung von NE-Vesikeln im TEM bei 190 000-facher Vergrößerung

Nach der Fixierung wurde gewaschen, mit Osmiumtetroxid nachfixiert und anschließend in einer Alkoholreihe steigender Konzentration dehydratisiert. Die Proben wurden dann in Epon eingebettet. Ultradünnschnitte wurden mit Uranylacetat nachkontrastiert und dann im TEM betrachtet.

Die Untersuchungen zeigten, daß die Heparin-NE-Suspension fast völlig aus Vesikeln besteht.

Um die Ferritinaufnahme und die -verteilung in Vesikeln untersuchen zu können, wurden Vesikel mit Ferritin beladen und für das TEM vorbereitet. Die Ferritinverteilung ist dabei durch eine schwarze Körnerung im Präparat erkennbar. Die Untersuchungen ergaben, daß die meisten der Vesikel mit Ferritin gefüllt sind. Ferritin ist dabei gleichmäßig über den gesamten Querschnitt verteilt.

2.3.3.2. Darstellung im Raster-Elektronenmikroskop (REM)

Die Vorbereitung der NE-Vesikel für das REM entsprach der Vorbereitung für das TEM einschließlich der Dehydratisierung der Präparate durch die Alkoholreihe. In einigen Fällen wurde jedoch nicht mit Osmiumtetroxid fixiert. Dann wurde der Alkohol in kleinen Schritten gegen Isoamylacetat ausgetauscht. Die Proben wurden nach der Critical-Point-Methode getrocknet, die getrockneten Proben mit Gold bedampft und im REM betrachtet. Bei der Untersuchung der sehr empfindlichen Strukturen, wie es die NE-Vesikel darstellen, im REM, traten zunächst einige Schwierigkeiten auf. So bedeutet z.B. die Trocknung nach der Critical-Point-Methode eine Beanspruchung des Materials und setzt eine bestimmte Stabilität der Präparate voraus. Deshalb wurden auch hier die Vesikel in Anwesenheit von Ferritin präpariert, um Ferritin einzuschließen. Ferritin ist aufgrund seines hohen Eisengehaltes sehr gut für die Elektronenmikroskopie geeignet, weil die Eisenatome Zentren hoher Elektronendichte darstellen. Erst aufgrund der Anwesenheit von Ferritin war es möglich, die Vesikel im REM darzustellen.

Wie die Untersuchungen zeigten, bilden die Vesikel zu einem

großen Teil Aggregate. Inwieweit das allerdings als eine Folge der Vorbereitung für die Darstellung im REM anzusehen ist, ist unklar.

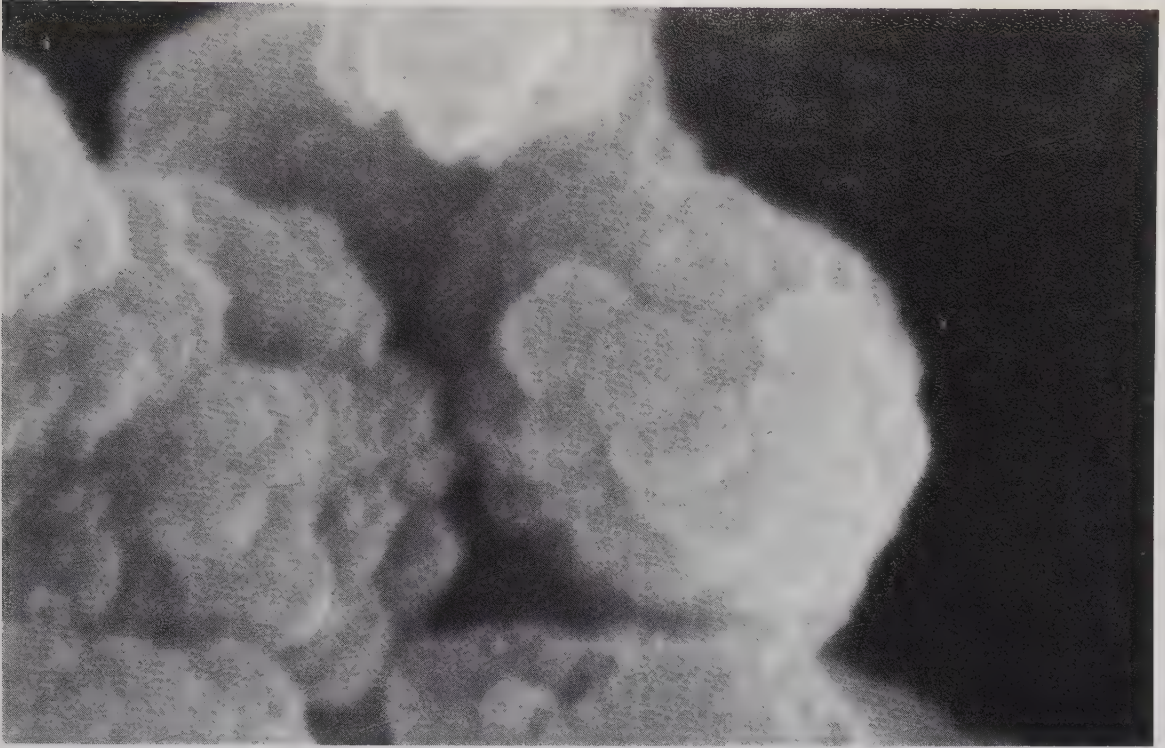


Abb.14 Darstellung von NE-Vesikeln im REM bei 86 000-facher Vergrößerung

2.3.3.3. Messung der Eisenverteilung in NE-Vesikeln in einem REM-Präparat

Bei dieser Technik wurde das REM-Präparat aus ferritinbeladenen NE-Vesikeln mit einer Energie von 20 keV bestrahlt. Dabei wird das in den Ferritinmolekülen enthaltene Eisen angeregt. Der angeregte Zustand ist instabil, die angeregten Elektronen der Eisentome fallen auf einen niedrigeren Energiezustand zurück. Dabei wird eine der Spektrallinie $k_{\alpha 1}$ des Eisens entsprechende Energie von 6.4 keV emittiert. Die

emittierte Strahlung wird von einem Detektor aufgefangen, der mit dem REM gekoppelt ist.

Wie die Untersuchungen zeigten, findet sich in den Vesikeln eine hohe Eisendichte. Während nur etwa 20-30% der Vesikel nicht markiert sind, sind die übrigen Vesikel mit Ferritin beladen.

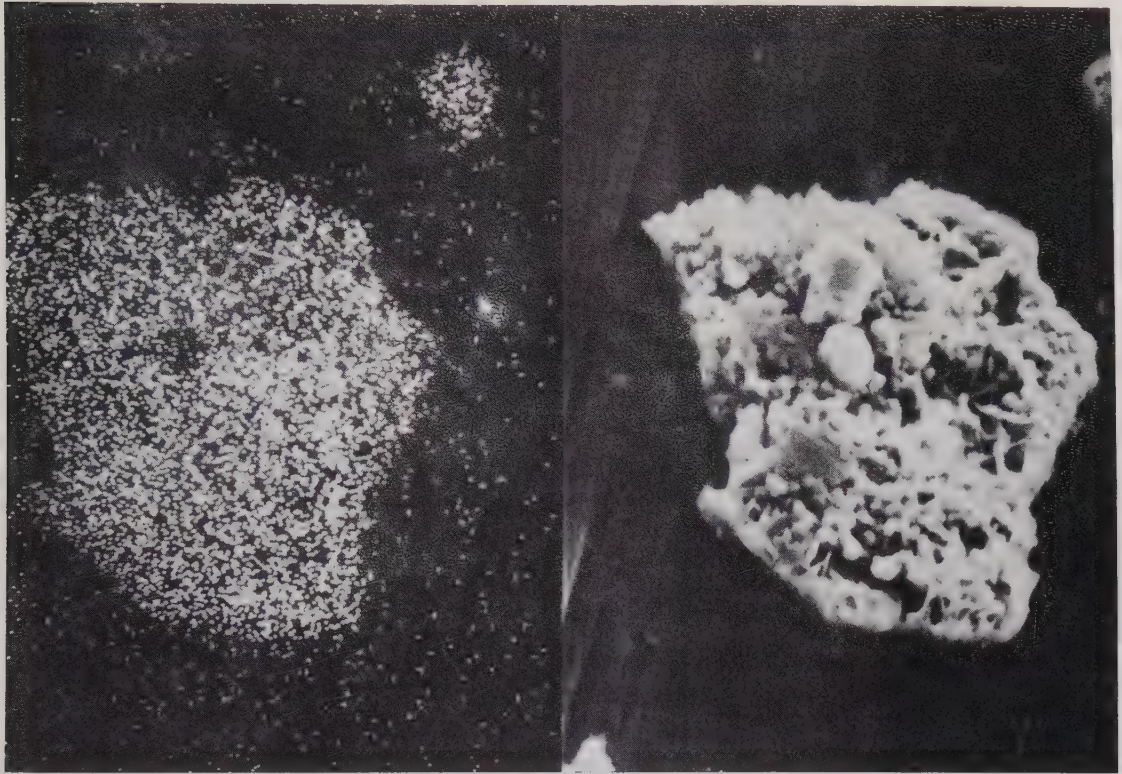


Abb.15 Messung der Eisenverteilung in mit Ferritin beladenen .
NE-Vesikeln; Methode: EDX (KEVEX)

Damit ist auch durch elektronenmikroskopische Untersuchungen nachgewiesen, daß die mittels Heparin dargestellten NEs Vesikel bilden. In diese Vesikel können sehr große Moleküle, wie z.B. Ferritin mit einem MG von 465 000, bis zu einer hohen Konzentration eingeschlossen werden.

2.4. Bestimmung des Volumens von Zellkernen und NE-Vesikeln

Die Bestimmung des internen Volumens der Kerne und Vesikel erfolgte in Analogie zu der von Kletzien et al. (152) beschriebenen Methode unter Verwendung von ^{14}C -Glukose. Dabei setzt man voraus, daß die zur Volumenbestimmung eingesetzte Verbindung inert ist, d.h. im Meßzeitraum weder im Stoffwechsel verbraucht noch an irgendwelche Komponenten adsorbiert wird. Es sollte sich lediglich bei ausreichend langer Inkubationszeit ein Diffusionsgleichgewicht zwischen dem zu bestimmenden und dem Inkubationsvolumen einstellen. Nach Abtrennung der Kerne und Vesikel und Messung der Radioaktivität kann hieraus und aus dem bekannten Inkubationsvolumen und der darin gemessenen Radioaktivität direkt das unbekannte Volumen berechnet werden.

Für die Kerne ergab sich ein Volumenanteil von $20.63 \mu\text{l/ml}$ bzw. von 2.06% als Mittelwert aus drei Messungen. Bei einem Proteingehalt für die Kerne von 2.27 mg/ml im Inkubationsmedium (Mittelwert aus vier Meßreihen) ist das Volumen demnach

$$9.09 \mu\text{l/mg Protein.}$$

Hieraus kann man auf das Volumen eines einzelnen Zellkerns schließen, denn nach Aaronson und Blobel (11) sind

$$66 \mu\text{g Kernprotein} = 3 \pm 0.2 \times 10^6 \text{ Kerne.}$$

Danach ist das mit diesen Messungen ermittelte Volumen

$$2 \times 10^{-7} \mu\text{l pro Zellkern.}$$

Von Kirschner et al. (153) wird nach Untersuchungen im REM der Durchmesser von Zellkernen nach Messungen an frisch isolierten, mit Glutaraldehyd fixierten bzw. mit Ethanol dehydratisierten Zellkernen mit $7.5 \mu\text{m}$ angegeben, woraus man ein Volumen von

$$2.2 \times 10^{-7} \mu\text{l pro Zellkern}$$

berechnen kann. Aufgrund der guten Übereinstimmung beider Ergebnisse kann man davon ausgehen, daß die Meßmethode mit Glukose auch geeignet ist, um das Volumen der Vesikel zu bestimmen.

Nach der gleichen Methode ergab sich für die Vesikel ein

Volumenanteil von 19.17 $\mu\text{l}/\text{ml}$ bzw. von 1.91% als Mittelwert aus drei Messungen. Bei einem Proteingehalt von 2.23 mg/ml im Inkubationsmedium (Mittelwert aus vier Meßreihen) ist das Volumen demnach

8.60 $\mu\text{l}/\text{mg}$ Protein.

Die im Anschluß durchgeführten Transportmessungen wurden mit einer Proteinkonzentration von 2 mg/ml durchgeführt. Somit ist der Volumenanteil für die Kerne 1.8% und für die Vesikel 1.72%.

Mit Hilfe des bekannten Volumens kann man auf die Affinität der Kerne bzw. Vesikel zu verschiedenen Proteinen schließen, weil die Aufnahme aller Proteine ohne jegliche Affinität im Bereich des Volumens liegen müßte, da es sich lediglich um Diffusionsprozesse bis zum Äquilibrium handelt.

2.5. Transportmessungen an NE-Vesikeln

2.5.1. Diskussion verschiedener Methoden zur Durchführung von Transportmessungen

Bei Transportmessungen an Zellkernen und NE-Vesikeln wird die zu untersuchende und radioaktiv markierte Substanz zunächst mit dem biologischen Material inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten muß dann das biologische Material vom Inkubationsmedium abgetrennt werden. Dazu gibt es verschiedene Möglichkeiten:

Die Trennung kann mittels Filtration durch Zelluloseporenfilter durchgeführt werden. Bei dieser Methode nach Dalmark und Wieth (154) kann man dann die Radioaktivität, die das an den Filtern haftende biologische Material aufgenommen hat, bestimmen. Dabei ist es wichtig, daß man die Größe der Kerne und Vesikel genau kennt, um eine Porengröße der Filter zu wählen, die den vollständigen Rückhalt des biologischen Materials gewährleistet. Während der Durchmesser der Kerne leicht zu bestimmen ist, schwankt er bei den Vesikeln beträchtlich. Nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen liegt der Durchmesser der Vesikel etwa eine bis zwei Zehner-

potenzen unter dem Durchmesser der Kerne. Dies erfordert eine sehr geringe Porengröße der Filter, wodurch eine Messung in kurzen Zeitabständen nicht möglich ist, da das Aufziehen eines Aliquots des Inkubationsmediums erhebliche Zeit in Anspruch nimmt.

Daneben können Transportmessungen mittels Zentrifugalfiltration durchgeführt werden. Diese Methode ist von Klingenberg (155) entwickelt worden und wurde von Kondor-Koch (4) insofern modifiziert, als sehr kurze Inkubationszeiten bis zu fünf Sekunden bei geringem Arbeitsaufwand meßbar sind. Die Messung erfolgt in einer Beckman Mikrofuge in 400 μ l-fassenden Mikrofugenröhrchen mit einem geeigneten Dichtegradienten aus Inkubationsmedium, inertem Silikonöl und Enteiweißungsmittel. Das biologische Material wird in das Mikrofugenröhrchen gefüllt und mit der zu untersuchenden Substanz inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wird die Inkubation durch Zentrifugation beendet. Bei dieser Zentrifugation wird das biologische Material pelletiert und in Perchlorsäure denaturiert, während nicht aufgenommene Substanz im Überstand verbleibt und durch die Trennschicht aus Silikonöl vom Pellet abgetrennt wird. Die Zeit, die das biologische Material benötigt, um vom Überstand durch die Trennschicht in die Perchlorsäure zu gelangen, ist im Vergleich zur Inkubationszeit sehr klein und daher vernachlässigbar (4). Die Inkubation wird deshalb mit dem Starten der Zentrifuge als beendet angesehen. Die Spitzen der Mikrofugenröhrchen werden am Ende der Zentrifugation abgeschnitten und ihre Radioaktivität in einem Flüssigkeits-Szintillationszähler gemessen.

Um zu gewährleisten, daß es einerseits an der Grenzfläche Inkubationsmedium-Silikonöl zu einem raschen Übertritt des biologischen Materials in das inerte Silikonöl kommt, andererseits an der Grenzfläche Silikonöl-Perchlorsäure durch die Denaturierung keine Gemische geringerer Dichte als die des Silikonöls entstehen, die in das Silikonöl zurückwandern könnten, ist eine optimale Auswahl der Dichten von Silikonöl und Perchlorsäure besonders wichtig. Hier wurde Silikonöl der Dichte $d = 1.03$ und Perchlorsäure der Dichte $d = 1.06$

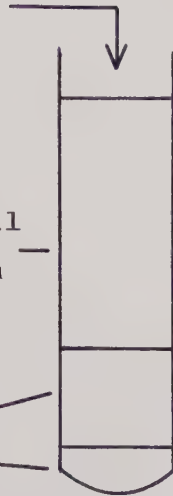
verwendet (4).

zu untersuchende
radioaktiv markierte
Substanz

biologisches Material
im Inkubationsmedium

Silikonöl: $d = 1.03$

HClO_4 : $d = 1.06$



Polypropylen-Mikrofugen-
röhrchen
Volumen: $400 \mu\text{l}$

Abb.16 Schema der in dieser Arbeit angewandten Methode der Zentrifugalfiltration

2.5.2. Messungen mit radioaktiv markierten Histonen an Zellkernen und NE-Vesikeln

Histone sind die Hauptproteine des Chromatins und am Aufbau der Überstruktur der DNA-Doppelhelix beteiligt. Die Grundeinheit ist das Nukleosom (36,37). Der Kern dieses Nukleosoms ist ein Tetramer aus den Histonen H3 und H4, denen je zwei Dimere aus H2A und H2B aufliegen. Über dieses Proteinoktamer ist dann die DNA mit etwa 200 Basenpaaren und zwei Umdrehungen gewunden (156). Das Histon H1 ist am Aufbau der Nukleosomen-Grundstruktur und am "coiling" der DNA nicht beteiligt. Es ist an den Stellen, wo die DNA-Doppelhelix in ein Nukleosom übergeht bzw. das Nukleosom verläßt, mit der DNA assoziiert.

In vivo sind die Histone häufig modifiziert. Zu diesen Modifikationen gehören: Acetylierung (157,158), Phosphorylierung (159,160), Methylierung (161) und ADP-Ribosylierung (161-163). Histon H2A kann darüber hinaus kovalent an das Protein

Ubiquitin gebunden sein (164).

Alle Histone des Nukleosomen-Grundgerüsts werden nach der Translation acetyliert, u.z. in einer oder mehreren Lysin-Seitenketten im N-terminalen Drittel der Proteine (37). Es besteht offenbar eine Korrelation zwischen der Acetylierung und der Genaktivität. Die Acetylierung vermindert die positive Nettoladung der Histone und könnte dadurch die Bindung zwischen DNA und Histonen schwächen. Allerdings konnte gezeigt werden, daß die Acetylierung keinen oder nur einen sehr kleinen Effekt auf die Stabilität des Nukleosomen-Grundgerüsts hat (siehe (37)).

Die Phosphorylierung ist eine Veresterung einer Serin-Seitenkette , u.z. wieder im N-terminalen Teil des Proteins. Auch die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung der Histone ist mit einer Reihe von biologischen Aktivitäten gekoppelt, so z.B. mit der Kondensation der Chromosomen in der Mitose (165).

Sämtliche Histone können in Anwesenheit von NAD ADP-ribosyliert werden, wobei H1 ein Hauptakzeptor zu sein scheint.

In der Zelle ist die Synthese von Histonen mit der DNA-Synthese gekoppelt. Im Verlauf der Replikation verdoppelt sich die DNA und die neu replizierte DNA bildet mit Histonen rasch die Nukleosomen-Struktur aus. Dabei assoziiert ein Teil der neu synthetisierten Histone sowohl mit replizierenden als auch mit nicht replizierenden Regionen des Chromatins (166). Während H3 und H4 spezifisch auf neu replizierter DNA abgelagert werden, binden H2A und H2B nur teilweise, H1 gar nicht bevorzugt an die neu entstehende DNA (167). Der Hauptteil der neu synthetisierten Histone bildet jedoch völlig neue Nukleosomen, d.h. ohne Beteiligung von bereits vorhandenen Histonen, die symmetrisch auf die beiden Tochterstränge verteilt werden (167,168). Jeder Tochterstrang enthält am Ende der Replikation etwa gleiche Mengen an bereits vorhanden gewesenen und neuen Nukleosomen.

2.5.2.1. Präparation von Histonen aus Kalbsthymus

Die Präparation der Histone erfolgte nach der Methode von Johns (169). Danach wird die Kalbsthymus zunächst mehrmals mit physiologischer Kochsalzlösung und mit Ethanol homogenisiert. Die Fraktion, die die Histone H2A, H3 und H4 enthält, gewinnt man durch Extraktion mit einem Ethanol-Salzsäure-Gemisch, die Histone werden anschließend selektiv aus dem Extrakt präzipitiert. Das Pellet nach der ersten Extraktion enthält noch die Histone H1 und H2B, die durch Salzsäure extrahiert werden. Aus dem Extrakt kann man dann zuerst H1 und danach H2B mittels Aceton präzipitieren. Für die Transportmessungen wurde ein Histongemisch aus den Histonen H1, H2A, H2B, H3 (sehr wenig) und H4 verwendet. Die Reinheit des Gemisches wurde durch eine PAGE überprüft.

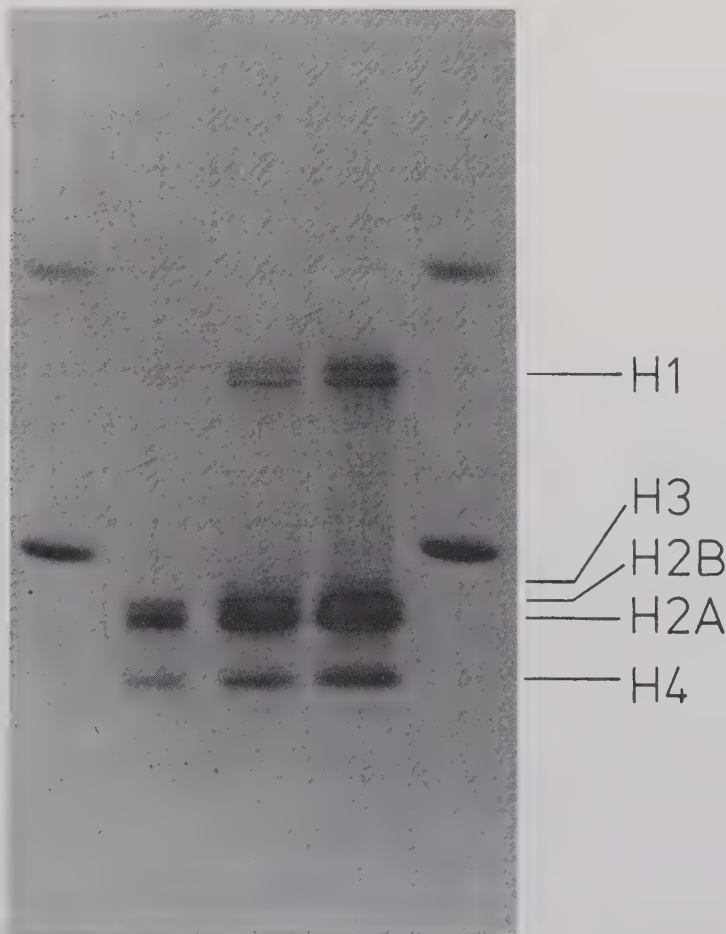


Abb.17 18% Plattengel des verwendeten Histongemisches.

10 µg, 20 µg und 30 µg der Histone wurden aufgetragen;
außen links und außen rechts = MG-Standards: Ovalbu-
min MG 44 600, Trypsin-Inhibitor MG 20 100

2.5.2.2. Messung der Adsorption von Histonen an die Membranen von Zellkernen und NE-Vesikeln

Bei den Transportmessungen muß streng zwischen einer Adsorption der zu untersuchenden Substanz an das biologische Material und ihrer echten Aufnahme unterschieden werden. Dabei muß man davon ausgehen, daß jede Substanz, die in die Kerne bzw. Vesikel transportiert wird, zu einem geringen Anteil an die Kernmembran adsorbiert wird. Der Anteil der Adsorption sollte im Vergleich deutlich unter dem durch Transport aufgenommenen Anteil liegen.

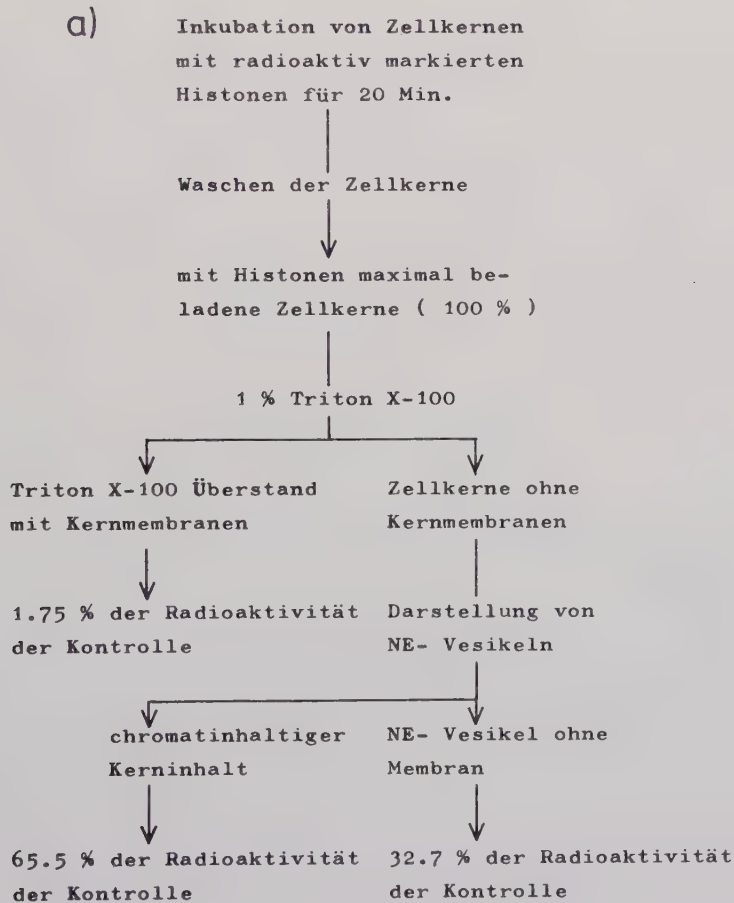


Abb.18a) Messung der Adsorption von Histonen an die Kernmembranen und der Verteilung von Histonen in Zellkernen

Um dies zu untersuchen, wurden Zellkerne und Vesikel so lange mit Histonen inkubiert, bis keine Radioaktivität mehr aufgenommen wurde. Die überschüssige Radioaktivität wurde durch mehrmaliges Waschen der Kerne bzw. Vesikel entfernt. Nachdem die Überstände frei waren von Radioaktivität, wurde die Kern- bzw. Vesikel-Suspension zur Entfernung der Kernmembranen mit 1% Triton X-100 inkubiert. Nach der Inkubation wurde zentrifugiert und die Radioaktivität in den Triton-X-100-Solubilisaten gemessen. Die Zellkerne wurden anschließend mittels Heparin subfraktioniert und der Anteil der Histone im Chromatinüberstand und in den membranfreien NE-Vesikeln gemessen.

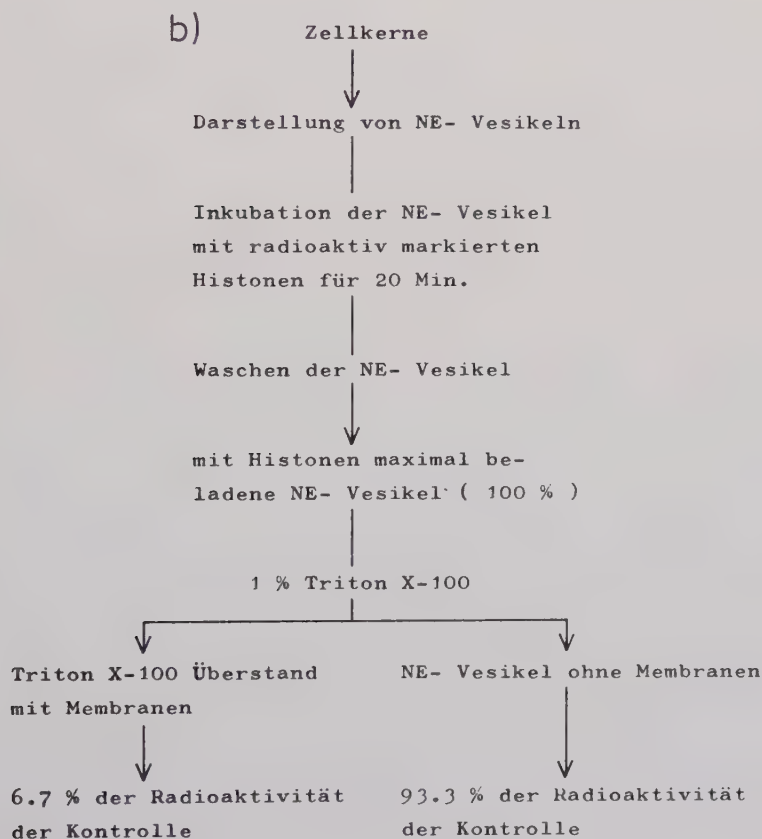


Abb.18b) Messung der Adsorption von Histonen an die Vesikelmembranen und der Verteilung von Histonen in NE-Vesikeln

Wie die Abbildungen 18a und 18b zeigen, ist der an die Kernmembranen adsorbierte Anteil an Histonen für die Zellkerne 1.75% und für die NE-Vesikel 6.7% der gebundenen Histone. Die übrigen Histone sind an intranukleare bzw. intravesikuläre Komponenten fest gebunden. Erwartungsgemäß kann man für die Zellkerne zeigen, daß die Chromatinfraktion der Hauptbindungsort der Histone ist.

2.5.2.3. Kinetik der Histonaufnahme in NE-Vesikel

Das Ergebnis der Messung der Histonaufnahme in NE-Vesikel zeigt Abbildung 19. Wie zu erkennen ist, handelte es sich um einen sehr raschen Prozeß, dessen Maximum nach etwa zwei Minuten erreicht war und der dann in ein Plateau überging. Die aufgenommene Menge an Histonen lag im Maximum bei etwa 50% der Histone im Inkubationsmedium bzw. bei 2.51 μg Histonen pro μg DNA, wenn man den DNA-Gehalt zugrundelegt. Sie ist damit etwa 25 Mal größer, als man unter Berücksichtigung des Volumenanteils der Vesikel erwarten würde. Das bedeutet, daß die Histone in den Vesikeln stark akkumuliert werden. Als Hauptbindungsort wird dabei die noch in den Vesikeln verbleibende DNA vermutet, die ja etwa 2% beträgt. Schon früher wurde an Zellkernen gezeigt, daß diese Histone enorm akkumulieren können (70) und daß die Aufnahme z.B. in Erythroblasten unter in vivo-Bedingungen sehr schnell, nämlich im Bereich von etwa zehn Sekunden, verläuft (170). Wie von Cox gezeigt wurde (171), ist die Histonaufnahme auch in isolierten HeLa-Zellkernen ein sehr schneller Vorgang, dessen Kinetik mit der an Rattenleberzellkernen (ohne Abbildung) und den hier gemessenen Werten an NE-Vesikeln sehr gut übereinstimmt.

Die Histonaufnahme in NE-Vesikel ist durch GTP stimulierbar, wobei sowohl die Aufnahmegeschwindigkeit als auch die Bindungskapazität erhöht sind. Neben GTP wurde auch der Effekt von GDP, GMP, cGMP, Guanosin, ATP, cAMP und CTP auf die Histonaufnahme getestet. Dabei war in allen Fällen, außer bei CTP, ein geringer stimulierender Effekt meßbar. CTP

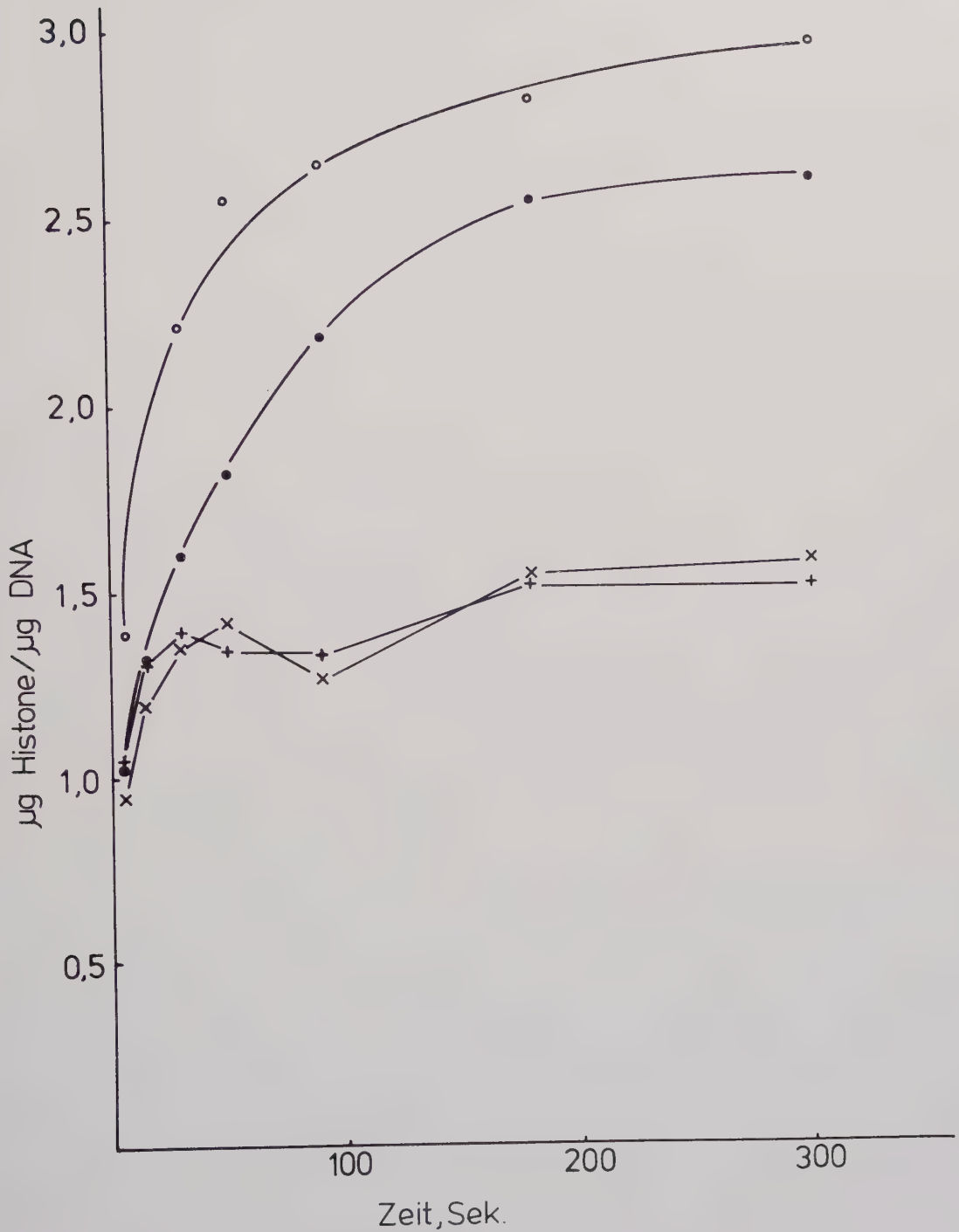


Abb.19 Kinetik der Histonaufnahme in NE-Vesikel (●) und der Histonadsorption an DNase-NEs (+). Während GTP die Aufnahme von Histonen in NE-Vesikel stimuliert (O), hat es keinen Einfluß auf die Adsorption von Histonen an DNase-NEs (X).

Die angegebenen Meßwerte sind Mittelwerte aus acht (NE-Vesikel) bzw. fünf (DNase-NEs) Messungen.

hingegen hemmte die Histonaufnahme. Im Vergleich war der Effekt von GTP und GDP am deutlichsten. Die Stimulation ist bereits bei einer Konzentration der Nukleotide von 3 mM zu erkennen, in den Messungen wurde aber eine Konzentration von 10 mM eingesetzt. Um die Frage zu klären, ob GTP und GDP über eine Abspaltung des γ - bzw. β -Phosphatrestes die Aktivierung bewirken, wurde die Histonaufnahme ebenfalls in Anwesenheit von Guanosin-5'-($\beta\gamma$ -methylen)-Triphosphat, anstelle von GTP, gemessen. Der Effekt war von dem des GTP nicht zu unterscheiden.

Zu vergleichenden Messungen wurden DNase-NEs nach Dwyer und Blobel (142) präpariert. Diese offenen NEs sollten zu einer Histonaufnahme nicht fähig sein, dennoch aber eine gute Bindung von Histonen zeigen, denn an den DNase-NEs findet man noch einen verbleibenden DNA-Gehalt von 3.4%. Wie die Abbildung 19 zeigt, war das Verhalten der DNase-NEs gegenüber Histonen deutlich verschieden von der Histonaufnahme in NE-Vesikel. Während in den NE-Vesikeln die Histonaufnahme im Verlauf von 300 Sekunden um 140% zunahm, war die Zunahme bei den DNase-NEs nur 48%. Die Bindungskapazität der Vesikel war bezogen auf den DNA-Gehalt um 65% höher.

Im Falle der DNase-NEs ist die Bindung der Histone nur ein Adsorptionsprozeß an die auf der Innenseite der NEs liegenden Komponenten (vor allem DNA). Dieser Adsorptionsprozeß ist nach etwa 50 Sekunden beendet und geht in ein Plateau über. Für die Vesikel nimmt die Aufnahme im Verlauf von etwa 250 Sekunden kontinuierlich zu, sie ist das Ergebnis eines Transportes bzw. einer Diffusion durch den NE und einer anschließenden Assoziation an die NE-Komponenten. Um die Vesikel zu zerstören, wurden sie sehr hart homogenisiert und dann erst mit Histonen inkubiert. Dabei zeigte sich, daß die Histonaufnahme deutlich verschlechtert war und die " Vesikel " eine den DNase-NEs vergleichbare Bindungskinetik zeigten.

Wie Abbildung 19 ebenfalls zeigt, war die Bindung von Histonen an DNase-NEs von GTP und auch von allen anderen getesteten Nukleotiden unabhängig.

Um zu zeigen, daß die Kernmembranen keinen Einfluß auf die

Histonaufnahme haben, wurden die Messungen mit Kernen und Vesikeln durchgeführt, die zuvor mit Triton X-100 inkubiert wurden. In den darauf folgenden Messungen war die Aufnahme von Histonen unverändert, ein Phänomen, daß auch an isolierten HeLa-Zellkernen zu sehen ist (171). Elektronenmikroskopisch sind die Zellkerne und die Vesikel in ihrer Morphologie auch nach einer Inkubation mit Triton X-100 unverändert (siehe Abbildung 6).

2.5.2.4. Kinetik des Histoneffluxes aus NE-Vesikeln

Die Effluxmessungen wurden nach Prasad et al. (172) bzw. Ohsumi und Anraku (173) durchgeführt. Dabei wurden die Vesikel zunächst mit Histonen inkubiert. Das Inkubationsmedium enthielt entweder keine Nukleotide oder GTP bzw. GDP in einer Konzentration von 10 mM. Nach zehn Minuten, d.h. wenn die Histonaufnahme ein Plateau erreicht hatte, wurde ein zehnfacher Überschuß nicht radioaktiv markierter Histone zugegeben und zu verschiedenen Zeiten die Radioaktivität in den Vesikelpellets bestimmt.

Bei diesen Messungen handelt es sich um einen Austausch-Efflux. Er ist ein Maß dafür, ob eine aufgenommene Substanz frei im intravesikulären Volumen vorliegt bzw. ob sie an intravesikuläre Komponenten gebunden ist und wie stabil diese Bindung ist.

Wie die Abbildung 20 zeigt, tauschten nur etwa 33% der Histone im Verlauf von 300 Sekunden aus. Im Gegensatz dazu war in Anwesenheit von GTP und besonders von GDP fast kein Austausch meßbar. In Analogie zu den Aufnahmemessungen wurde auch hier in Anwesenheit von GMP, cGMP und Guanosin gemessen. Diese Verbindungen hatten alle einen schwachen Effekt, der jedoch sehr deutlich unter dem GTP- bzw. GDP-Effekt lag. Die Ergebnisse müssen so interpretiert werden, daß in Anwesenheit von GTP bzw. GDP nicht nur die Bindungskapazität, sondern auch die Affinität der Vesikel zu den Histonen erhöht wird. Die aufgenommenen Histone sind, wie auch zu erwarten ist, an intravesikuläre Komponenten gebunden. Diese

Bindung kann durch GTP bzw. GDP stabilisiert werden.

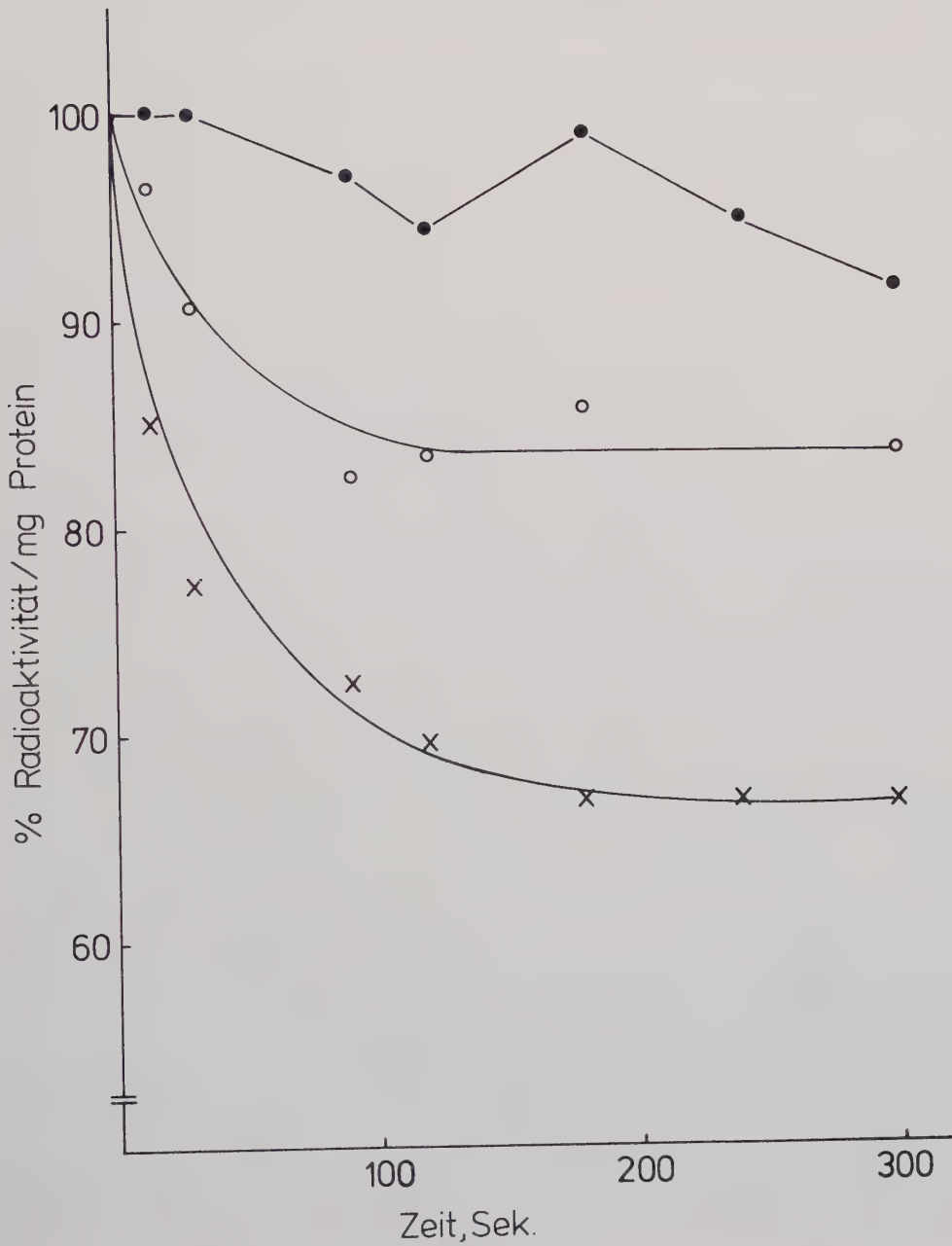


Abb.20 Kinetik des Austausch-Effluxes von Histonen aus NE-Vesikeln in Abwesenheit von Nukleotiden (X) und in Anwesenheit von 10 mM GTP (○) und 10 mM GDP (●). Die angegebenen Meßwerte sind Mittelwerte aus zwei Experimenten.

2.5.2.5. Messung des Heparingehaltes von NE-Vesikeln

Verursacht Heparin die Assoziation von Histonen in NE-Vesikeln?

Bei der Solubilisierung der Zellkerne zur Darstellung von Heparin-NEs wird das Polyanion Heparin verwendet. Heparin bildet dabei mit Histonen Heparin-Histon-Komplexe, die nach der Zentrifugation im Überstand erscheinen (144). Es sollte untersucht werden, ob bei der hier verwendeten Methode zur Darstellung von NE-Vesikeln eventuell Heparin mit den Vesikelkomponenten assoziiert bleibt und dadurch in den Transportmessungen mit Histonen die Assoziation der Histone mit den NE-Vesikeln zustandekommt.

Um dies zu untersuchen, wurde die Präparation von NE-Vesikeln mit radioaktiv markiertem Heparin durchgeführt. Die Methylierung mit ^{14}C -Methanol erfolgte in Analogie zu der Vorschrift von Bendtzen und Rocklin (174). Die Kernsuspension wurde mit ^{14}C -Heparin inkubiert. Sofort nach der Zugabe des Heparins wurde die Radioaktivität in der Suspension gemessen. Nach der Inkubation wurde zentrifugiert und die Radioaktivität im Überstand gemessen, wobei keine Abnahme der Radioaktivität festgestellt wurde. Die pelletierten NE-Vesikel wurden wie üblich zweimal in Inkubationspuffer gewaschen, rehomogenisiert und die Radioaktivität in der Vesikelsuspension gemessen. Dabei fanden sich 0.056% (= Mittelwert aus zwei verschiedenen Präparationen) des Heparins mit den Vesikeln assoziiert, was 0.553 μg Heparin pro mg Vesikelprotein entspricht.

Die bei den Aufnahmemessungen von Histonen eingesetzten Konzentrationen liegen bei 100 μg Histonprotein pro mg Vesikelprotein. Dies ist im Vergleich zu dem gebundenen Anteil an Heparin ein 180-facher Überschuß, weshalb der Effekt des Heparins als vernachlässigbar angesehen werden muß. Ein Teil der mit ^{14}C -Heparin markierten Vesikel wurde zur Entfernung der Membranen mit 1% Triton X-100 inkubiert und die Radioaktivität im Überstand und in den rehomogenisierten Vesikeln gemessen. Es zeigte sich, daß von dem gebundenen

^{14}C -Heparin 25% mit Triton X-100 entfernt werden konnten, dieses Heparin somit an die Membranen adsorbiert war.

Der andere Teil der ^{14}C -markierten Vesikel wurde in eine Transportmessung mit Histonen eingesetzt. Dabei zeigte sich eine wie in Abbildung 19 dargestellte Aufnahmekinetik. Damit war nachgewiesen, daß die mit ^{14}C -Heparin präparierten Vesikel sich gegenüber Histonen nicht von den mit nicht radioaktivem Heparin dargestellten Vesikeln unterscheiden haben.

2.5.2.6. Histonaufnahme in NE-Vesikel nach Behandlung mit DNase I

Wie unter 2.2.1. dargestellt, ist der DNA-Gehalt der NE-Vesikel $20.47 \mu\text{g}/\text{mg}$ Vesikelprotein und liegt deutlich unter dem DNA-Gehalt der DNase-NEs.

Es sollten drei Fragestellungen untersucht werden:

Kann man durch Inkubation der Vesikel mit steigenden Konzentrationen an DNase I den an den Vesikeln verbleibenden DNA-Gehalt vermindern?

Ändert sich nach der Inkubation und dem Herauswaschen der DNase I die Histonaufnahme in den so behandelten Vesikeln?

Kann man in mit radioaktiv markierten Histonen beladenen Vesikeln durch Behandlung mit DNase I eine Verminderung der Radioaktivität erreichen?

Dazu wurden zunächst Vesikel präpariert. Ein Teil der Vesikelsuspension wurde in fünf Fraktionen aufgeteilt, die ohne DNase I bzw. mit steigenden Konzentrationen an DNase I bei Zimmertemperatur inkubiert wurden. Nach der Inkubation wurden die einzelnen Fraktionen gewaschen und in Inkubationspuffer rehomogenisiert. Ein Teil der Fraktionen wurde zur Bestimmung des DNA-Gehaltes verwendet. Dabei zeigte sich, daß in Anwesenheit von hohen DNase I-Konzentrationen der DNA-Gehalt der Vesikel um etwa 20% vermindert werden konnte. Aufnahmemessungen mit Histonen, die mit dem anderen Teil der Fraktionen durchgeführt wurden, zeigten alle eine völlig übereinstimmende Aufnahmekinetik. Der etwas verminderte DNA-

Gehalt der Vesikel hatte keinen Effekt auf die Bindungs-
kapazität für Histone.

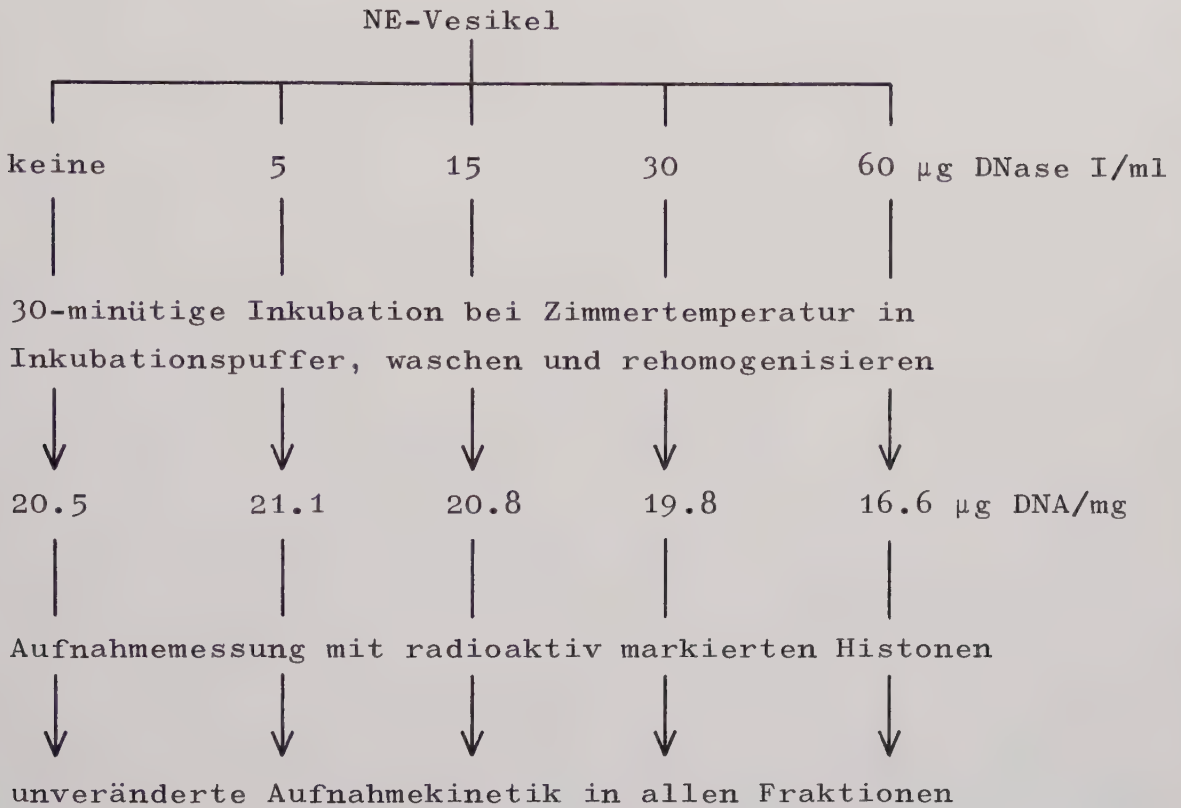


Abb.21 Messung des DNA-Gehaltes und der Aufnahme von Histonen
in NE-Vesikeln nach Inkubation mit DNase I

Bei der DNase I-Inkubation von Vesikeln, die mit radio-
aktiv markierten Histonen beladen waren, konnte nach der
30-minütigen Inkubation mit 5, 15, 30 und 60 µg DNase I/ml
keine Abnahme der Radioaktivität in der Vesikelsuspension
gemessen werden.

Der Effekt des Heparins auf die Solubilisierung des Chro-
matins aus Zellkernen ist also vollständig. Eine gering-
fügige Verminderung des noch verbleibenden DNA-Gehaltes kann
nur durch einen großen Überschuß an DNase I erreicht werden.
Sie führt jedoch bei der anschließenden Messung der Histon-
aufnahme in diese Vesikel zu keiner Veränderung.

2.5.2.7. Histonaufnahme in NE-Vesikel nach Vorinkubation mit steigenden Mengen an nicht markierten Histonen; Sättigung der Histonaufnahme

Durch Vorinkubation mit nicht markierten Histonen können die intravesikulären Bindungsstellen besetzt werden. Bei steigenden Konzentrationen nimmt dabei die Zahl der noch freien Bindungsstellen ab und durch eine anschließende Inkubation mit radioaktiv markierten Histonen erhält man ein Maß für die noch freien Bindungsstellen und damit für die Bindungskapazität der NE-Vesikel. Erst wenn sämtliche Bindungsstellen gesättigt sind, reflektiert die Messung mit radioaktiv markierten Histonen nur noch eine Diffusion in den Intravesikulärraum und sollte dann im Bereich des Volumens der Vesikel liegen.

Eine Vesikelsuspension wurde mit der 10-fachen (= 1 mg Histone/mg Ves.-Prot.), 50-fachen (= 5 mg Histone/mg Ves.-Prot.) und 100-fachen (= 10 mg Histone/mg Ves.-Prot.) Konzentration der in Transportmessungen eingesetzten Histone vorinkubiert. Nach zehn Minuten wurde zentrifugiert, gewaschen und in Inkubationsmedium rehomogenisiert. Dann wurde die Histonaufnahme mit radioaktiv markierten Histonen gemessen. Wie Abbildung 22 zeigt, waren selbst bei einer Histonkonzentration von 5 mg/mg Vesikelprotein noch nicht alle Bindungsstellen abgesättigt. Erst bei einer Histonkonzentration von 10 mg/mg Vesikelprotein führte die anschließende Aufnahmemessung mit radioaktiv markierten Histonen von 0.5% zu Beginn der Messung bis 2.5% nach 300 Sekunden. Wie unter 2.4. dargestellt, wurde für die Vesikel ein Volumen im Inkubationsmedium von 1.72% berechnet. Somit spiegelt diese Aufnahmemessung eine Diffusion bis zum Äquilibrium ohne anschließende Assoziation in den Vesikeln wider. Diese Messungen zeigen ebenfalls, daß die schon gebundenen Histone fest mit den intravesikulären Komponenten assoziiert sind, denn auch hier ist im Verlauf der Messung kein Austausch mit nicht radioaktiven Histonen meßbar.

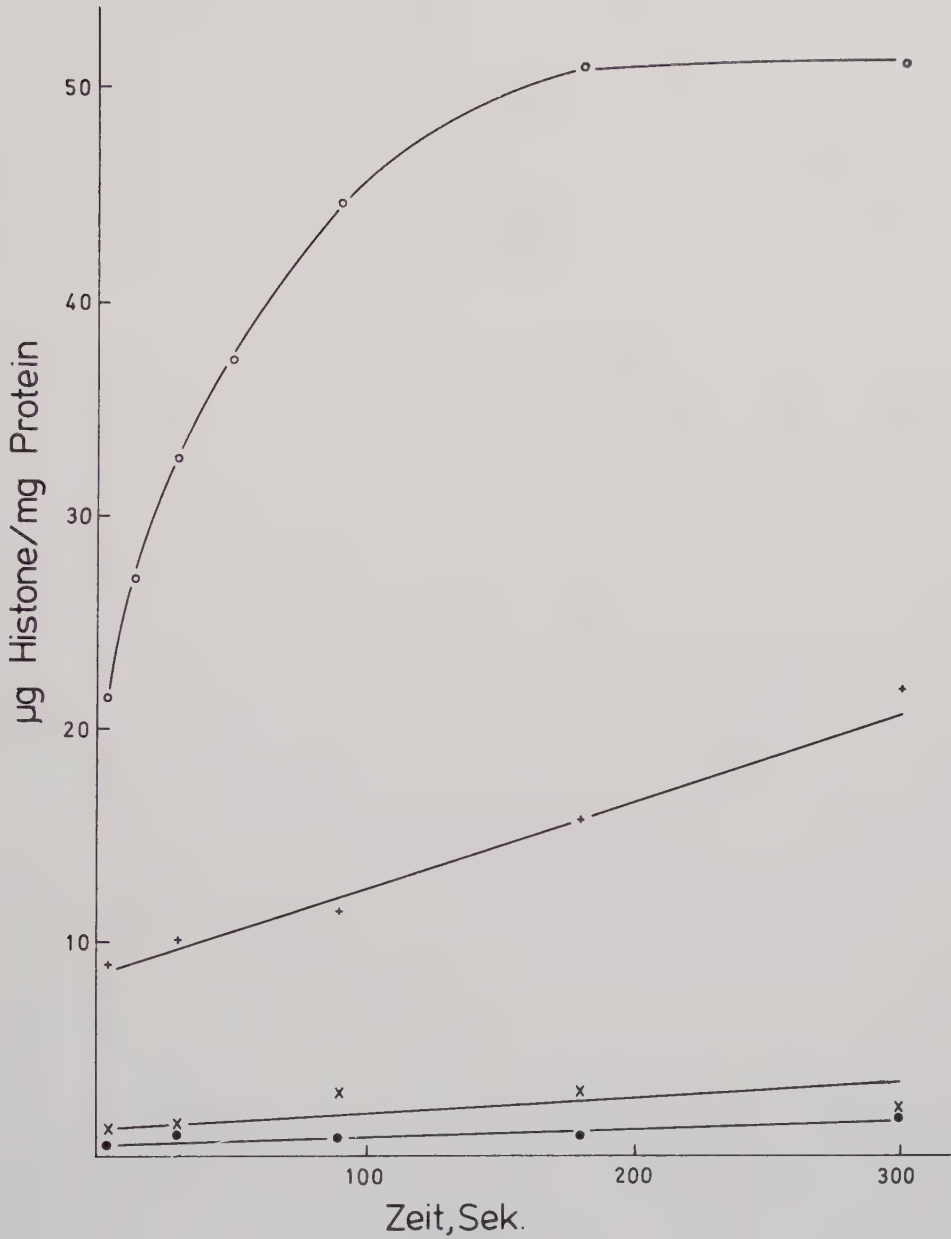


Abb.22 Aufnahmekinetik von Histonen in NE-Vesikel ohne Vorinkubation der Vesikel mit Histonen (O) und nach einer Vorinkubation mit 1 mg Histonen/mg Ves.-Prot. (+), 5 mg Histonen/mg Ves.-Prot. (X) und 10 mg Histonen pro mg Ves.-Prot. (●). Die Meßwerte sind Mittelwerte aus drei Messungen.

Um ein weiteres Maß für die Bindungskapazität zu erhalten, wurde die Vesikelsuspension mit steigenden Konzentrationen radioaktiv markierter Histone inkubiert. Nach einer Inkubation von zehn Minuten wurde zentrifugiert und die Radioaktivität in den Vesikelpellets gemessen.

Das Ergebnis zeigt Abbildung 23:

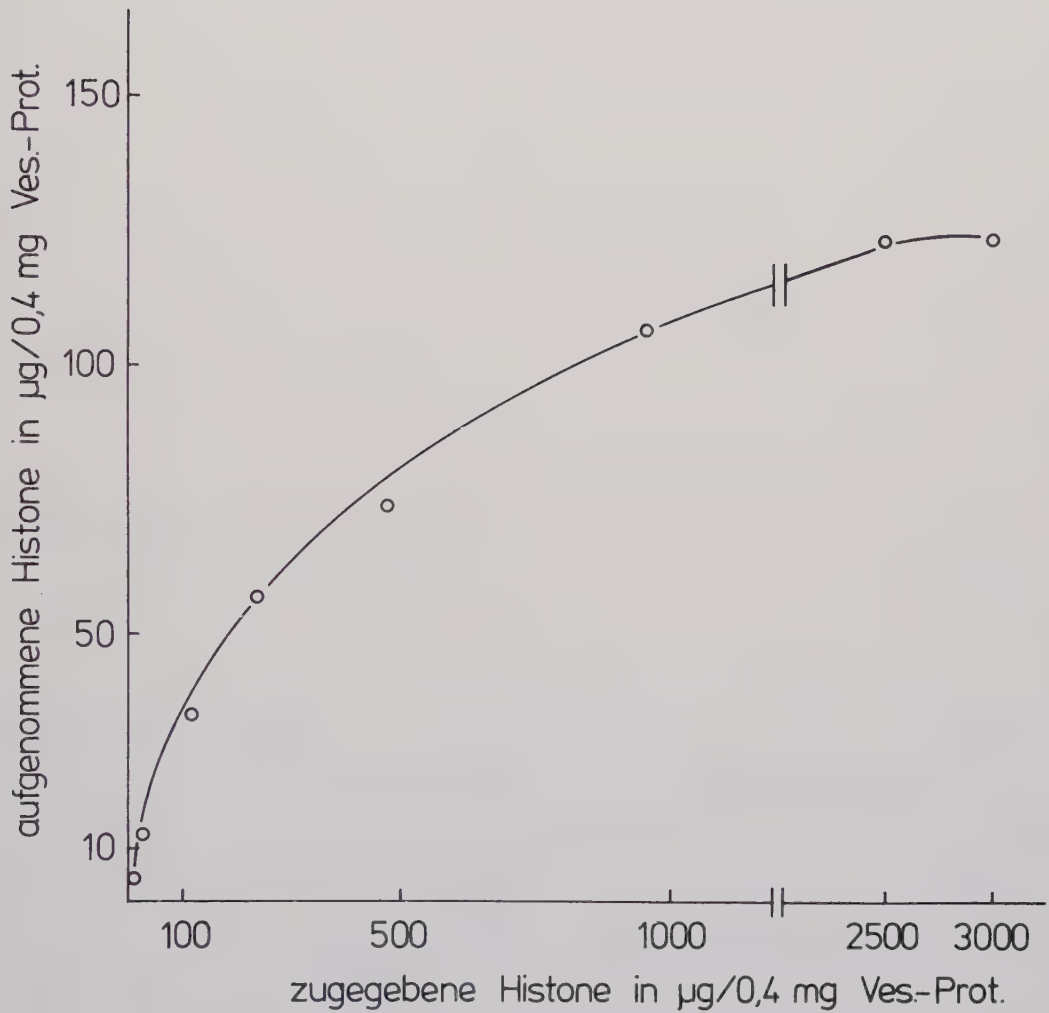


Abb.23 Messung der Sättigung der Histonaufnahme in NE-Vesikel

Die Bindungskapazität der Vesikel lag bei etwa 130 μ g Histonen/ 0.4 mg Vesikelprotein. Diese Zahl ist viel größer, als man im Vergleich zu dem DNA-Gehalt der Vesikel erwarten würde. Auch von Bonner (65) wurde festgestellt, daß nach Mikroinjektion von Histonen ins Zytoplasma von Oozyten, diese im Zellkern beträchtlich akkumuliert wurden. Diese Anreicherung war etwa 700 Mal größer, als mit einer ausschließlichen Bindung an die DNA erklärt werden konnte.

Da außerdem die einzelnen Histone nicht alle die gleiche Affinität zu den Zellkernen haben, unterschiedliche Konzentrationen aufgenommen werden und um die Aufnahme konkurrieren (65), muß vermutet werden, daß neben der Bindung an die DNA auch noch andere Faktoren bei der Anreicherung im Kern eine wichtige Rolle spielen. So wurde von Bonner angenommen (65), daß die Histone u.U. im Kern durch Selbstassoziation stabile Aggregate bilden, die zu groß sind, um den Kern wieder verlassen zu können.

2.5.3. Messungen mit HMG-Proteinen (high-mobility-group Proteine) und sauren chromosomalen Proteinen an NE-Vesikeln

HMG-Proteine haben ihre Bezeichnung von ihrer relativ schnellen Wanderung in der Essigsäure-Harnstoff-PAGE (175). In Säugerzellen unterscheidet man vier verschiedene HMG-Proteine, HMG1, HMG2, HMG14 und HMG17. Sie kommen in Säugerzellen in einer Konzentration von 10^5 - 10^6 Molekülen pro Zellkern vor und man nimmt an, daß es sich eher um strukturelle als um genregulatorische Komponenten des Chromatins handelt (176,177). Die HMG-Proteine sind weit verbreitet, sie sind außer in Säugerzellen auch in Vögeln, Fischen, Insekten und Pflanzen zu finden (176,178). In den verschiedenen Organismen sind sie mit 10-20% der Nukleosomen assoziiert (177), wobei diese Assoziation bevorzugt (179), jedoch nicht ausschließlich (176,180,181) in Regionen aktiven Chromatins liegt. Entfernt man durch milde Nuklease-Verdauung solche Nukleosomen, die stark mit transkribierenden

DNA-Sequenzen und hyperacetylierten Histonen angereichert sind, so geht damit eine Anreicherung der HMG-Proteine einher (179). Während man vermutet, daß HMG1 und HMG2 bei der Destabilisierung bzw. beim Aufwinden von Doppelstrang-DNA eine Rolle spielen, sind HMG14 und HMG17 direkt mit Nukleosomen assoziiert. Alle Nukleosomen haben zwei spezifische Bindungsstellen für HMG14 und HMG17 und diese beiden HMG-Proteine sind sowohl mit " inaktiven " als auch mit " aktiven " Nukleosomen assoziiert (181,182).

HMG-Proteine unterliegen wie die Histone einer Vielzahl von postsynthetischen Modifikationen. Dazu gehören die Methylierung (183), Acetylierung (184), Phosphorylierung (185-187), Poly(ADP)-Ribosylierung (188) und Glykosylierung (189).

Bei der Glykosylierung sind Zuckerketten kovalent mit dem Protein verknüpft. Eine wichtige Funktion der Glykosylierung von HMG14 und HMG17 scheint in einer dadurch ermöglichten Assoziation dieser beiden Proteine mit der Kernmatrix und dem NE zu liegen. Entfernt man enzymatisch die Kohlenhydratketten, so wird dadurch die Bindung an die Kernmatrix und an den NE drastisch vermindert (177). Da man annimmt, daß die Kernmatrix sowohl an der RNA-Transkription (51) als auch an der DNA-Replikation (41-45) beteiligt ist, könnte die Assoziation der HMG-Proteine mit dieser Kernstruktur eine Rolle bei der strukturellen Organisation der aktiven Domänen des Chromatins im Zellkern spielen (177).

Im Gegensatz zu den genau charakterisierten HMG-Proteinen stellen die sauren chromosomalen Proteine ein breites Spektrum von Polypeptiden mit Molekulargewichten von etwa 20 000 bis über 200 000 dar. Sie sind eigentlich die Nicht-Histon-Proteine des Chromatins. Auch den sauren chromosomalen Proteinen wird eine Funktion als spezifische Genregulatoren zugeschrieben (190,191). So wird vermutet, daß sie an der Bindung von Steroidhormon-Rezeptor-Komplexen am Chromatin beteiligt sind (192).

2.5.3.1. Präparation von HMG-Proteinen und sauren chromosomalen Proteinen

Die Präparation der HMG-Proteine erfolgte nach Sanders (193). Dabei werden die Proteine, deren Molekulargewichte kleiner als 30 000 sind und die einen hohen Anteil an sauren und basischen Aminosäuren haben, mit Perchlorsäure aus dem Chromatin extrahiert. Nach der Zentrifugation wird zunächst das Histon H1 aus dem Überstand präzipitiert. Danach werden aus dem verbleibenden Überstand die HMG-Proteine mit Aceton prä-

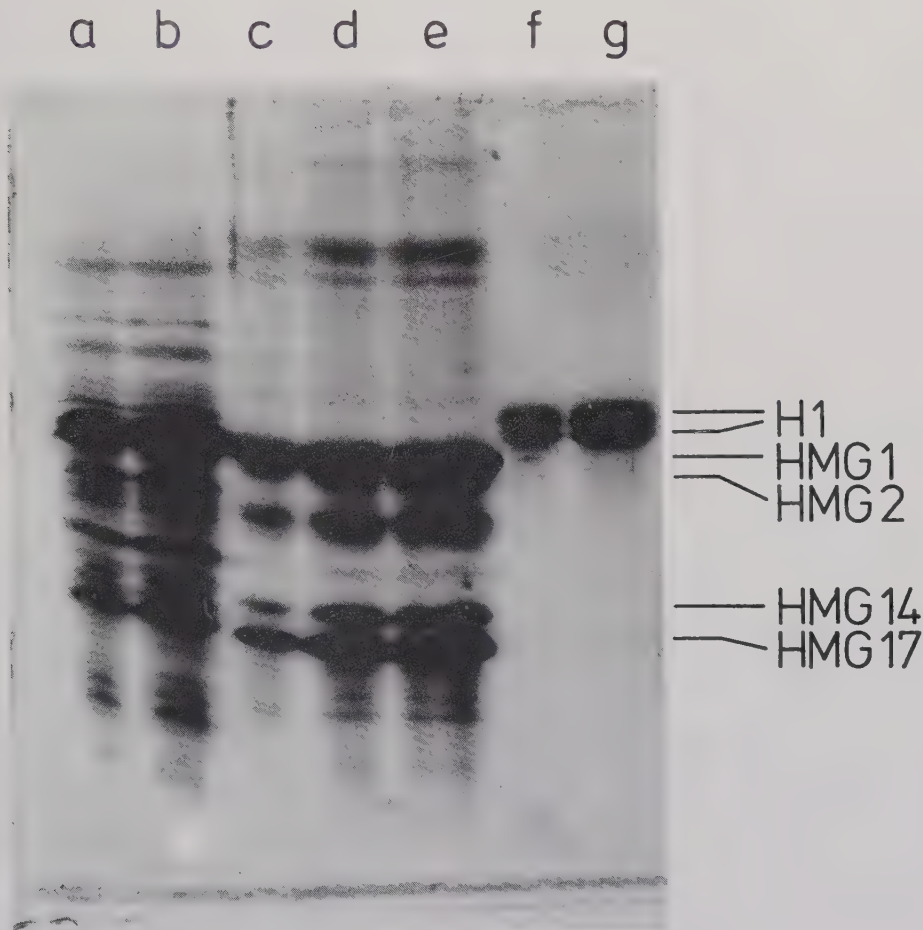


Abb.24 18% Plattengel der HMG-Proteine.

a, b = 50 μ g bzw. 100 μ g der HMG-Fraktion vor,
c, d, e = 12 μ g, 24 μ g bzw. 36 μ g der HMG-Proteine
nach der Säulenchromatographie;
f, g = 5 μ g bzw 10 μ g Histon H1.

zipitiert. Das Präzipitat wird dann durch eine CM-Sephadex C 25 Chromatographie mit einem linearen NaCl-Gradienten gereinigt und in die einzelnen HMG-Proteine 1, 2, 14 und 17 fraktioniert.

Die Abbildung 24 zeigt die HMG-Proteinfraktion vor der Säulenchromatographie und die nach der Fraktionierung vereinigten HMG-Proteine. Als Vergleich ist das in der Präparation isolierte Histon H1 dargestellt.

Bei der Präparation der sauren chromosomalen Proteine wurden zunächst die Zellkerne, wie unter 5.1. beschrieben, dargestellt. Die Isolierung des Chromatins erfolgte dann modifiziert nach Spelsberg und Hnilica (194), die anschließende Isolierung der sauren chromosomalen Proteine aus dem Chromatin modifiziert nach Wilson und Spelsberg (190).

Die Präparation verläuft schematisch in drei Schritten, der

- Entfernung der Histone unter sauren Bedingungen, wobei die extrahierten Histone nach der Zentrifugation im Überstand verbleiben,
- Hydrolyse der DNA der histonfreien Chromatinfraktion mittels DNase I und der
- Präzipitation der sauren chromosomalen Proteine mit Perchlorsäure.

Die präzipitierten Proteine wurden im Puffer aufgenommen und nach dem Dialysieren lyophilisiert.

Die Markierung der HMG-Proteine und der sauren chromosomalen Proteine erfolgte mit ^{14}C -Acetanhydrid, die Proteine wurden dann auf eine Konzentration von 3 mg/ml eingestellt und zur Messung der Aufnahme in NE-Vesikel eingesetzt.

2.5.3.2. Kinetik der Aufnahme von HMG-Proteinen und sauren chromosomalen Proteinen in NE-Vesikel

Im Vergleich zu der Aufnahme von Histonen erstreckte sich die Aufnahme von HMG-Proteinen und sauren chromosomalen Proteinen bis zum Maximum über einen Zeitraum von vielen Stunden. Wie Abbildung 25 zeigt, war erst nach etwa

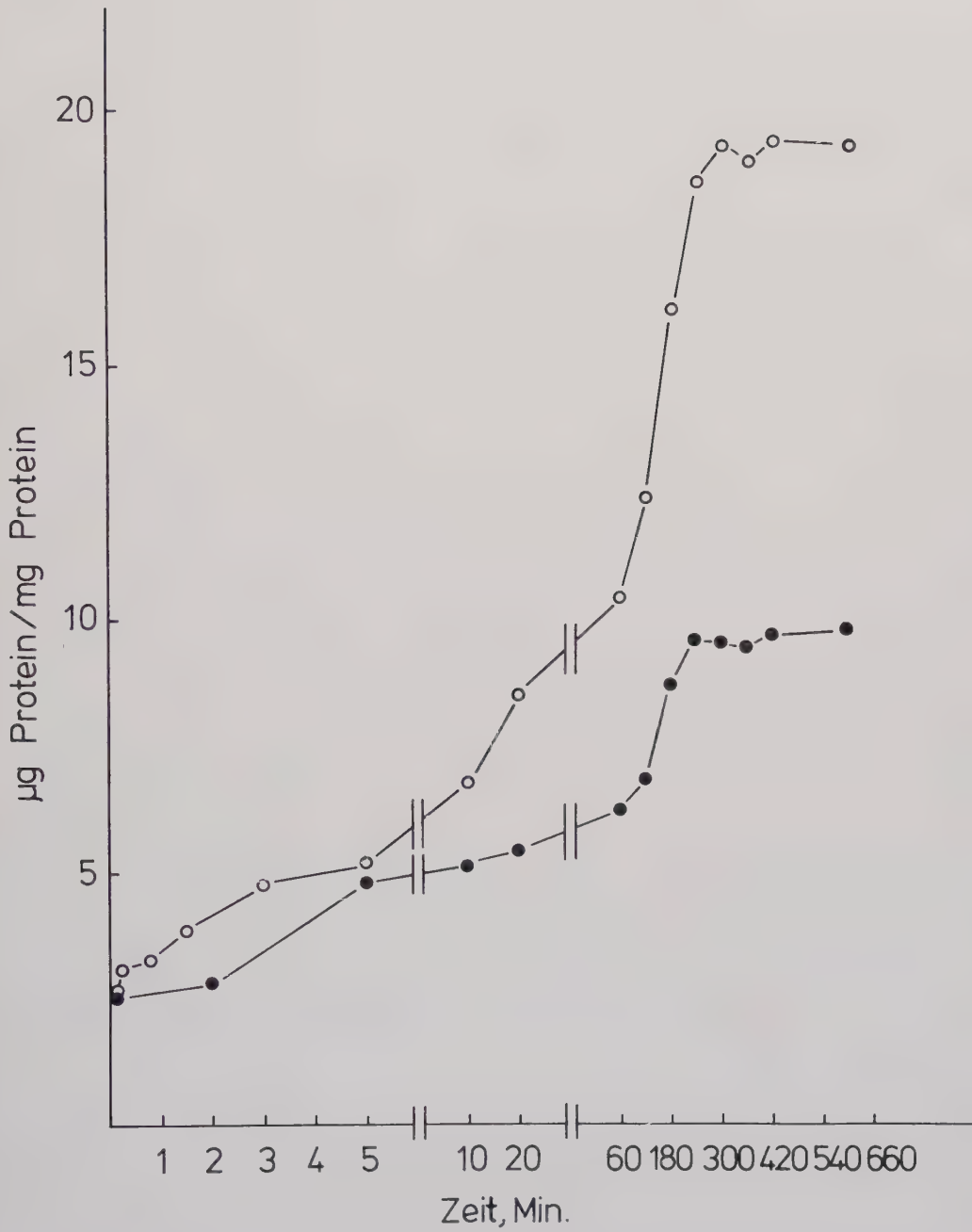


Abb.25 Kinetik der Aufnahme von HMG-Proteinen (●) und sauren chromosomalen Proteinen (○) in NE-Vesikel. Die Meßwerte sind Mittelwerte aus zwei Messungen.

7 Stunden keine weitere Aufnahme mehr feststellbar. Die Aufnahme der sauren chromosomalen Proteine war im gesamten Meßzeitraum größer, obgleich das Molekulargewicht der HMG-Proteine weit unter dem der sauren chromosomalen Proteine liegt. Bei der Messung der Adsorption von sauren chromosomalen Proteinen an DNase-NEs zeigte sich, daß die Assoziation sehr viel schneller verlief. Dies ist ein deutlicher Hinweis dafür, daß die sauren chromosomalen Proteine den NE der Vesikel nur verzögert durchqueren können. Den sauren chromosomalen Proteinen stehen an der am NE verbleibenden DNA eine Vielzahl von Bindungsstellen zur Verfügung, so daß eine gute Assoziation nicht überraschend ist. Im Gegensatz dazu haben die HMG-Proteine, deren Hauptbindungsort ja offenbar die Nukleosomen sind (181,182), keine sehr hohe Affinität zu den Vesikeln. Dennoch wird eine beträchtliche Menge an HMG-Proteinen aufgenommen, wenn man in Betracht zieht, daß die Konzentration an HMG-Proteinen im Zellkern nur etwa 3% des Gewichtes der DNA ausmacht (176). Offenbar können die HMG-Proteine außer an Nukleosomen auch an Komponenten des NE binden, wie dies auch von Reeves und Chang (177) beobachtet wurde.

Die Aufnahmemessungen wurden auch in Anwesenheit von 10 mM GTP und von 10 mM GDP durchgeführt. Weder für die HMG-Proteine noch für die sauren chromosomalen Proteine war dabei jedoch ein stimulierender Effekt meßbar.

2.5.3.3. Aufnahme von HMG-Proteinen in NE-Vesikel nach Vorinkubation mit Histonen

Dieser Versuch ging von folgenden Überlegungen aus:

Die Aufnahme der Histone in NE-Vesikel liegt unter den hier verwendeten Bedingungen bei 2.5 μ g Histonen/ μ g DNA. Da bei der Solubilisierung der Zellkerne mit Heparin fast alle Histone entfernt werden, muß vermutet werden, daß die in die Vesikel aufgenommenen und gebundenen Histone mit der DNA assoziiert sind. Isolierte Histone können mit DNA zu Partikeln rekonstituiert werden, die viele der Eigenschaften

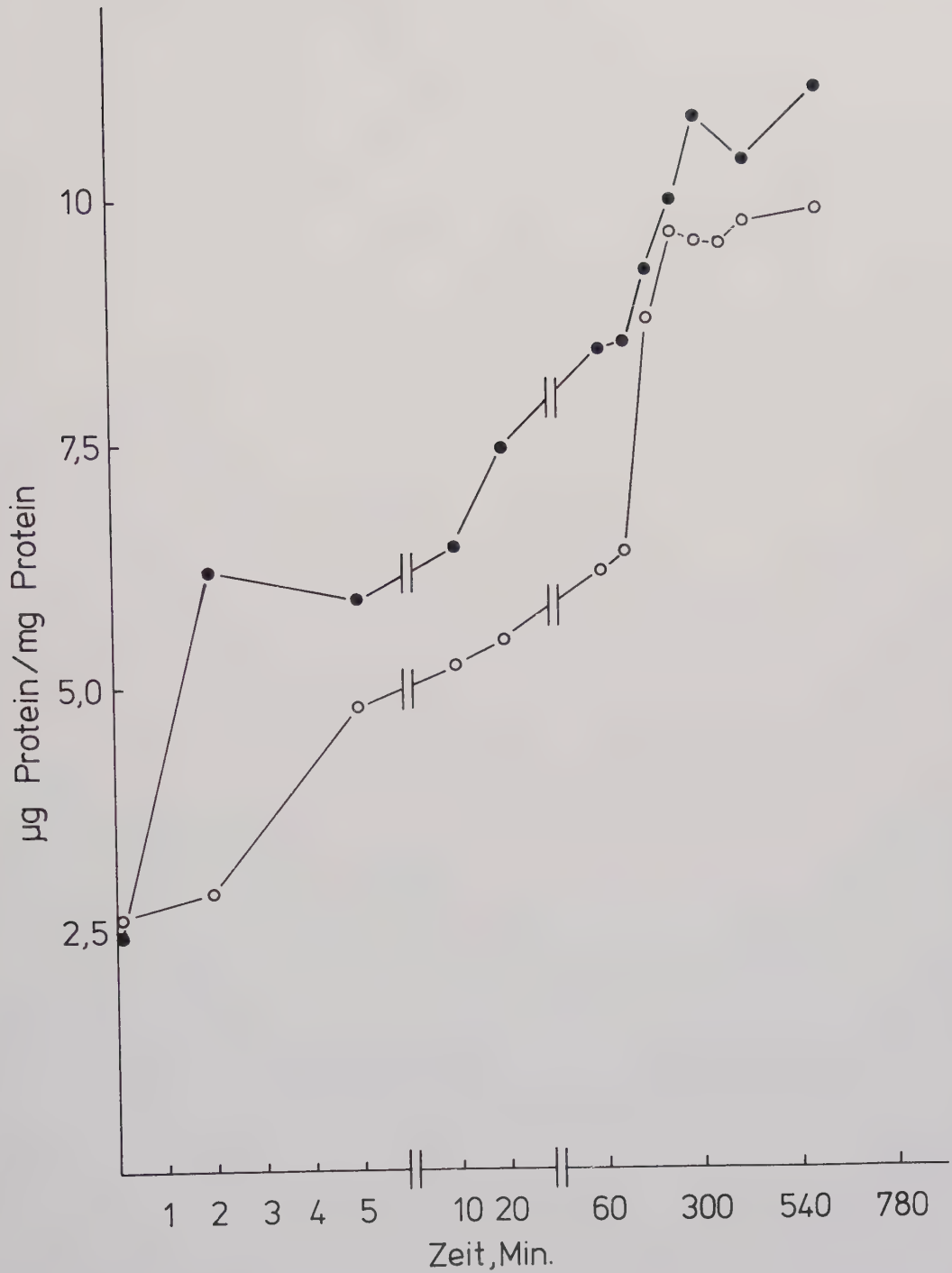


Abb.26 Kinetik der Aufnahme von HMG-Proteinen in NE-Vesikel ohne Vorinkubation (○) und nach Vorinkubation mit 800 µg Histonen/mg Vesikelprotein (●). Die Meßwerte sind Mittelwerte aus zwei Messungen.

des Chromatins haben (37). Dabei reicht eine DNA-Länge von 144 Basenpaaren, wie sie im Nukleosomen-Grundgerüst vorkommt, aus, um ein "core"-Partikel großer Genauigkeit zu machen (195). Auch aus isolierten Histonen und Poly(dA)-Poly(dT) kann man "core"-Partikel machen, an die HMG14 ebenso gut gebunden wird wie an native Nukleosomen (181). Wenn nun die von den Vesikeln aufgenommenen Histone mit den DNA-Fragmenten geordnete, d.h. Nukleosomen ähnliche Strukturen bilden, so könnte in den Vesikeln nach einer Vorinkubation mit Histonen die Anzahl der Bindungsstellen für HMG-Proteine erhöht sein und es müßten mehr HMG-Proteine mit den Vesikeln assoziieren.

NE-Vesikel wurden mit einem Überschuß an Histonen inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Vesikel in Inkubationspuffer gewaschen und rehomogenisiert. Dann wurde die Aufnahme von HMG-Proteinen gemessen, wobei ein Teil der NE-Vesikel, die nicht mit Histonen vorinkubiert wurden, als Vergleich dienten.

Das Ergebnis zeigt Abbildung 26. Nach einer Vorinkubation mit Histonen war die Aufnahme von HMG-Proteinen erhöht. Der Effekt war besonders im Anfangsbereich der Messung sehr deutlich. Ob die erhöhte Bindung durch spezifische Wechselwirkung oder aber einfach durch unspezifische Assoziation der sauren HMG-Proteine an Histon-Aggregate zustande kam, kann allerdings nicht gesagt werden. Als weitere Kontrolle wurde die Aufnahme des Histongemisches (Abb.17), von Histon H1, Poly-Lysin und Cytochrom c nach Vorinkubation mit dem Histongemisch gemessen. In allen Fällen war dabei die Aufnahme der Proteine deutlich vermindert. Dies zeigt, daß die getesteten Proteine alle mit den Histonen um die Bindungsstellen in den NE-Vesikeln konkurrieren. Im Falle der HMG-Proteine aber werden offenbar durch die Bindung der Histone die Anzahl der Bindungsstellen für die HMG-Proteine erhöht, was für eine geordnete Struktur der aufgenommenen Histone an der DNA der NE-Vesikel sprechen würde.

2.5.4. Messung der Aufnahme von Nicht-Kernproteinen in NE-Vesikel

Ein wichtiges Kriterium bei der Beurteilung der Aufnahmemessungen von Proteinen in die Vesikel ist die Frage nach der Spezifität des Prozesses. Nur wenn man zeigen kann, daß die Affinität und die Bindungskapazität für kerntypische Proteine, wie Histone, deutlich größer ist als für Proteine oder Polypeptide, die im Zellkern keine Funktion haben, können die Vesikel als Modellsystem für Untersuchungen des Transportes entlang des NE verwendet werden.

Untersuchungen an Oozyten-Kernen zeigten, daß z.B. γ -Globulin gar nicht von Zellkernen aufgenommen wird. Myoglobin wird zwar in die Zellkerne aufgenommen, aber im Vergleich zu Histonen in viel geringerem Maße (65). Aktin verteilt sich in Oozyten gleichmäßig zwischen Zellkern und Zytoplasma (76), von HeLa-Zellkernen wird es ebenfalls aufgenommen (171). Auch hier ist die Aufnahme von Histonen ein sehr schneller Prozeß.

NE-Vesikel wurden mit verschiedenen, radioaktiv markierten, kernuntypischen und kerntypischen Proteinen bzw. Polypeptiden inkubiert und die Kinetik der Aufnahme gemessen. Das Ergebnis zeigt Abbildung 27, wobei die Aufnahme von Histonen als Vergleich diente:

- γ -Globulin mit einem MG von 150 000 ist zu groß, um den NE von Zellkernen zu durchqueren (65). Bereits Rinder-serumalbumin (MG 68 800) ist schon zu groß, um per Diffusion durch die Kernporen zu gelangen (64,65,171). Das Kern:Zytoplasma-Verhältnis in Oozyten liegt am Ende der Messung bei 0.08.

Wie die Messung zeigte, nahm die Radioaktivität nicht zu, die gebundene Radioaktivität gab den an die Membran adsorbierten Anteil wider und lag mit etwa 6% im Bereich der für Histone und TPA ermittelten Werte der Membranadsorption.

- Myoglobin (MG 17 500) wird nach Mikroinjektion ins Zytoplasma von Oozyten im Zellkern angereichert (64,65). Im Verlauf von zwei Stunden wird dabei ein Kern:Zytoplasma-Verhältnis von zwei erreicht. Die Aufnahme ist dabei durch

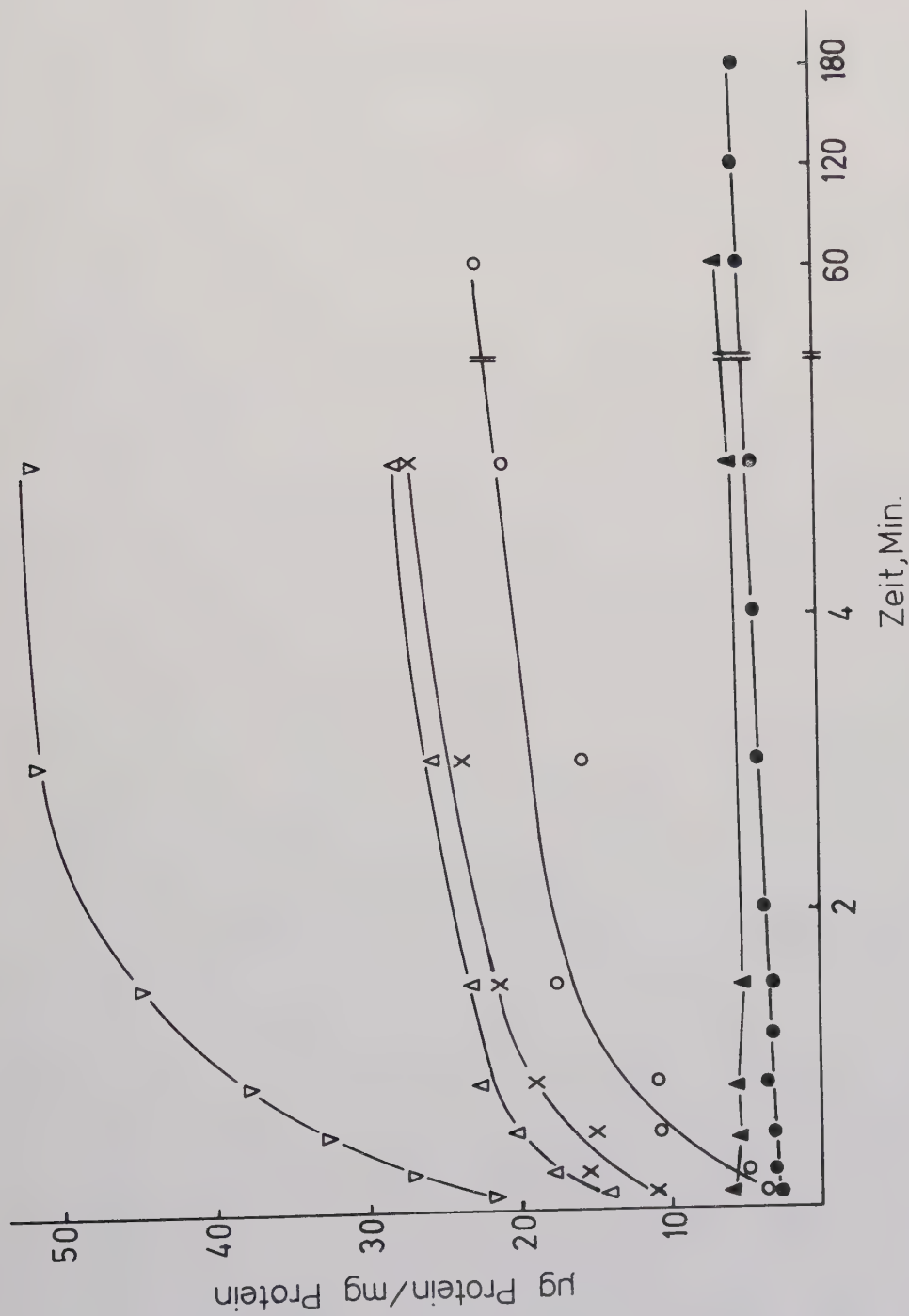


Abb. 27 Kinetik der Proteinaufnahme in bzw. der Proteinbindung an NE-Vesikel. Histone (▽), Poly-Lysin (Δ), Histon H1 (X), Myoglobin (O), γ-Globulin (▲) und Cytochrom c (●) wurden in einer Konzentration von 100 µg/mg Ves.-Prot. eingesetzt. Die Meßwerte sind Mittelwerte aus zwei Messungen.

eine Bindung an intranukleare Komponenten bedingt (64). Sie ist von der Ladung des Moleküls unabhängig, denn Myoglobin (isoelektrischer Punkt = 7) und Lysozym (isoelektrischer Punkt = 11) verhalten sich gleichartig (64).

Auch in den Vesikeln wurde Myoglobin angereichert, die aufgenommene Menge erreichte 40% der maximal gebundenen Histone.

- Der Vergleich der Aufnahme von Poly-Lysin und Histon H1, das von allen Histonen den höchsten Lysin-Gehalt hat (196), zeigte eine sehr ähnliche Kinetik. Wie von Bonner gezeigt werden konnte, ist die Aufnahme der einzelnen Histone in Oozyten-Kerne sehr verschieden. Selbst die am Nukleosomenaufbau beteiligten Histone (core histones) werden sehr unterschiedlich im Kern akkumuliert (65).
- Cytochrom c (MG 12 500, isoelektrischer Punkt etwa 10) ist als kleines und ebenfalls stark basisches Protein sehr gut für vergleichende Messungen mit Histonen geeignet. Bereits an Oozyten wurde gezeigt, daß Cytochrom c keinerlei Affinität zu Zellkernen hat (64). Nach der Mikroinjektion stellt sich sehr rasch ein Kern:Zytoplasma-Verhältnis von eins ein, das sich auch im Verlauf von fünf Stunden nicht ändert. Somit diffundiert Cytochrom c bis zum Äquilibrium in den Kern.

In den Messungen an NE-Vesikeln bestätigten sich die Ergebnisse von Paine und Feldherr (64). Obwohl das Protein klein genug ist, um den NE zu durchqueren, wurde es nicht in den Vesikeln angereichert. Die Zunahme der Radioaktivität von 2.7% auf 4.7% spiegelt einen Diffusionsprozeß wider, der nach etwa fünf Minuten abgeschlossen ist. Die aufgenommene Menge an Cytochrom c lag im Bereich des Volumenanteils der Vesikel im Inkubationsmedium und änderte sich auch im Verlauf von Stunden nicht.

Die Aufnahmemessungen mit sämtlichen Proteinen wurden auch in Anwesenheit von 10 mM GTP gemacht, jedoch war in keinem Fall ein stimulierender Effekt nachweisbar.

Damit ist gezeigt, daß die Vesikel spezifisch für Kernproteine eine hohe Affinität haben. Die Messungen an diesem

in vitro-System stimmen überein mit Ergebnissen in vivo nach Mikroinjektion in Oozyten (64,65) und mit Messungen an isolierten HeLa-Zellkernen (171).

2.6. Einfluß von verschiedenen Ribonukleinsäuren auf die ATPase der NE-Vesikel; Messung des Effluxes der Ribonukleinsäuren aus den NE-Vesikeln

Eukaryontische mRNA leitet sich ab von größeren RNA-Vorstufen, den heterogenen RNAs (hnRNAs). Die Umwandlung zur mRNA beinhaltet eine Anzahl von Einzelschritten, die man als Reifung bezeichnet. Dazu gehören die schon erwähnte Modifizierung des 5'-Endes (cap formation (93)), wobei ein 7-Methylguanosin über die 5'-OH-Gruppe seiner Ribose an einen Triphosphatrest unter Bildung einer 5'-5'-Triphosphatbrücke gebunden ist, die Polyadenylierung am 3'-Ende (94) und schließlich das Herausschneiden der Introns, bis eine monocistronische mRNA vorliegt. Nur etwa 10% der Nukleotide der hnRNAs treten in den zytoplasmatischen mRNAs auf. Die Prozesse der Reifung werden vollzogen, während die hnRNA fest mit Kernproteinen in sog. Ribonukleoprotein-Partikeln (hnRNP) assoziiert ist, möglicherweise sind diese hnRNP-Partikel selbst die Orte der Reifung im Zellkern (197). Die posttranskriptionalen Prozesse werden als sekundäre Regulationsmechanismen der Genexpression in Eukaryonten angesehen (111). Dabei kommt dem nukleozytoplasmatischen Transport der mRNA ebenso eine regulatorische Funktion der Genexpression zu. Zum Transport werden zytoplasmatische Proteine benötigt, die vom Zellkern vor allem zur Bildung von Ribonukleoprotein-Komplexen aufgenommen werden. Die Proteinfaktoren des Zytoplasmas haben einen direkten Einfluß auf die Transportrate für mRNA (109) und stellen als sog. Transportproteine eine spezifische Klasse von Zytoplasmaproteinen dar (111). Anomalien des mRNA-Transportes treten z.B. in transformierten Zellen auf (111).

Der nukleozytoplasmatische RNA-Transport verläuft durch die

Kernporen und ist in normalen Geweben ATP-abhängig (109-111). Werden isolierte Zellkerne mit ATP inkubiert, so kommt es vorwiegend zu einer Freigabe von mRNPs. Diese mRNPs offenbaren viele Ähnlichkeiten mit mRNPs in vivo. Sie sedimentieren in der Dichtegradienten-Zentrifugation im Bereich von 40-45 S, haben eine Dichte von 1.4 g/cm^3 , die für die zytoplasmatischen mRNPs charakteristisch ist und können in rekonstituierten Systemen in Polysomen inkorporiert werden (96). Präpariert man cDNA von zytoplasmatischer mRNA, so hybridisiert die aus isolierten Zellkernen freigesetzte mRNA damit ebenso gut wie die zytoplasmatische mRNA selbst, was eine beträchtliche Sequenzhomologie zwischen der in vitro transportierten und der im Zytoplasma vorliegenden mRNA anzeigt (96).

Die NE-ATPase, die am Transport beteiligt ist, ist durch RNA stimulierbar (98,108). Behandelt man die NEs mit RNase, so ist die ATPase-Aktivität anschließend um bis zu 40% vermindert (98,198). Durch Zugabe von RNA und besonders Poly(A) und Poly(G) kann die Aktivität des Enzyms wiederhergestellt werden. Poly(A) ist der beste Aktivator der ATPase (116). Wie von Agutter zuerst gezeigt wurde (199), ist der stimulierende Effekt von der Konformation der RNA abhängig. Während hier Poly(G) als Dreifachhelix einen besseren Effekt als die Einzelhelix zeigte, wurde von Müller et al. (116) gefunden, daß die Aktivierung der ATPase mittels Poly(A) von der Einzelhelix über die Doppelhelix zur Dreifachhelix abnimmt. Eine wichtige Voraussetzung ist, daß Poly(A) mit einer Kettenlänge von mehr als 15 AMP-Resten vorliegt (98, 116).

2.6.1. Effekt von Poly(A) auf die ATPase-Aktivität von NE-Vesikeln und DNase-NEs

Zu vergleichenden Messungen an NE-Vesikeln und DNase-NEs sollte zunächst der Einfluß von Poly(A) (MG größer 100 000) untersucht werden, weil hierfür bereits ein stark stimulierender Effekt nachgewiesen wurde (98,116). Poly(A) bindet

dabei mit recht hoher Affinität an die PCL-Fraktion (200).

Die NE-Vesikel bzw. DNase-NEs wurden in ATPase-Meßpuffer mit Poly(A) in steigenden Konzentrationen für zehn Minuten inkubiert und anschließend die ATPase-Aktivität gemessen.

Das Ergebnis zeigt Tabelle 4:

Fraktion	Poly(A) in µg/ml		ATPase-Aktivität in %
	Zugabe	Einschluß	
NE-Vesikel	-	-	100
	1	-	109
	3	-	101
	6	-	101
	10	-	111
	50	-	108
	200	-	111
	-	50	129
	-	600	153
DNase-NEs	-	-	100
	60	-	140

Tab.4 Einfluß von Poly(A) auf die ATPase-Aktivität von NE-Vesikeln und DNase-NEs. Die Aktivitäten der Kontrollen (= ohne Poly(A)) sind $84 \mu\text{mol } P_i \times \text{mg}^{-1} \times \text{Min.}^{-1} \times 10^{-3}$ für die NE-Vesikel und $49 \mu\text{mol } P_i \times \text{mg}^{-1} \times \text{Min.}^{-1} \times 10^{-3}$ für die DNase-NEs und wurden gleich 100% gesetzt.

Die angegebenen Meßwerte sind Mittelwerte aus drei Messungen.

Die ATPase der DNase-NEs, die weitgehend offene NE-Fragmente darstellen (143), war durch Poly(A) erwartungsgemäß stark stimulierbar. Bei einer Konzentration von $60 \mu\text{g Poly(A)/ml}$ war die Enzymaktivität 40% höher als in der Kontrolle (ohne Poly(A)-Zugabe). Die ATPase-Aktivität der NE-Vesikel war auch nach einer Inkubation mit bis zu $200 \mu\text{g Poly(A)/ml}$ höchstens um 10% im Vergleich zur Kontrolle stimulierbar.

Das bedeutet, daß Poly(A), zumindest während des hier gewählten Inkubationszeitraumes, nicht in der Lage ist, den NE der Vesikel zu durchqueren, um an der auf der Innenseite der Vesikel lokalisierten ATPase (106) einen Effekt hervorzurufen. Diese Messungen sind damit ein sehr guter Hinweis dafür, daß die NE-Vesikel-Suspension fast ausschließlich aus Vesikeln besteht. Ein Anteil von 85-90% Vesikeln in der Suspension wurde auch schon bei den Messungen mit TPA (siehe 2.3.1.4.) und aus Untersuchungen im TEM (siehe 2.3.3.) geschlossen. Daneben zeigen die Ergebnisse, daß die Vesikel dicht sind.

In einem weiteren Experiment wurde versucht, Poly(A) in die Vesikel einzuschließen. Dabei wurde genauso verfahren wie bei den Einschlußexperimenten mit TPA (siehe 5.3.3.1.). Wie die Tabelle 4 zeigt, war nach Einschluß von Poly(A) ein stark stimulierender Effekt an der ATPase meßbar. Bei einer zugegebenen Menge von 50 μg Poly(A)/ml zum Lysis-Puffer war im anschließenden ATPase-Aktivitätstest die Aktivierung 29%, bei 600 μg Poly(A)/ml 53% im Vergleich zur Kontrolle. Die Poly(A)-Konzentrationen wurden hier so hoch gewählt, weil während der Inkubation nur ein Bruchteil des Poly(A) in die Vesikel eingeschlossen wird. Nach Berechnungen, die auf dem ermittelten Volumen der Vesikel und auf den Versuchen mit radioaktiv markiertem Ferritin (siehe 2.3.2.2.) basieren, war die Poly(A)-Konzentration an den Vesikeln im anschließenden ATPase-Aktivitätstest 1.8 bzw. 22 μg Poly(A)/mg Vesikel-Protein. Da jedoch Polyribonukleotide gut an den NE gebunden werden (200), lag die Menge an Poly(A) pro mg Vesikel-Protein wahrscheinlich deutlich höher.

Ob nach dem Einschluß des Poly(A) und der daraus resultierenden Stimulation der ATPase auch ein Transport des Poly(A) aus den Vesikeln einherging, konnte in diesen Experimenten nicht gezeigt werden. Dafür müßte man den Einschluß mit radioaktiv markiertem Poly(A) durchführen.

2.6.2. Untersuchungen an NE-Vesikeln und DNase-NEs mit verschiedenen Ribonukleinsäuren

2.6.2.1. Präparation und Jodierung der verschiedenen Ribonukleinsäuren

Bei der Isolierung von hochmolekularen Nukleinsäuren besteht die Hauptaufgabe darin, einen Abbau der Nukleinsäuren vor allem durch zelluläre Ribonukleasen zu verhindern. Dabei muß der effiziente Ribonuklease-Inhibitor bereits zu Beginn der Präparation noch vor dem Homogenisieren zugegeben werden, da sonst bereits nach wenigen Sekunden ein Abbau erfolgt (201). Zur Hemmung von Ribonukleasen und zur Präparation von RNAs sind eine Vielzahl von Methoden beschrieben worden. So kann man nach dem Homogenisieren von Geweben und anschließender Zentrifugation einen postmitochondrialen Überstand mit RNase-hemmender Wirkung erhalten, den man bei der Präparation zusetzt (202,203). Bei den ursprünglich von Wiegers und Hilz (204) entwickelten Methoden wird die RNA-Präparation in Anwesenheit von Proteinase K oder Proteinase K/SDS durchgeführt, wobei durch SDS die Aktivität der Proteinase K verbessert wird und RNasen, DNasen und Phosphodiesterasen völlig gehemmt werden. Andere Methoden beschreiben die Verwendung von Phenol (205) oder Phenol/Chloroform (206) zur Extraktion der RNAs nach der Zentrifugation der Zellkerne. Dabei werden die mit der RNA assoziierten Proteine entfernt und die RNA mit Ethanol aus der wässrigen Phase gefällt. Die Phenolextraktion kann jedoch eine Aggregation der RNA verursachen, zeigt eine geringere Ausbeute und führt mitunter zum Verlust des Poly(A)-Endes der mRNA (207). Das häufig verwendete Diethylpyrocarbonat kann mit den Adenin-Anteilen der RNAs reagieren und dabei z.B. die Translationsaktivität der mRNA-Moleküle reduzieren (208). Die von Berger et al. (208) beschriebene Methode zur Verwendung von Ribonukleosid-Vanadyl-Komplexen als sehr wirksame Inhibitoren von RNasen sollte zunächst bei der Isolierung der verschiedenen RNAs angewendet werden. Bei der Verwendung der Methode von Palmiter (209) zur Präparation

von Polysomen, wurden deshalb anstelle von Heparin diese Komplexe eingesetzt. Die resultierenden Polysomenpellets ließen sich jedoch nur schwer für die Affinitätschromatographie rehomogenisieren und ergaben schlechte Ausbeuten. Ein Schema der Präparation der verschiedenen RNAs zeigt Abbildung 28:

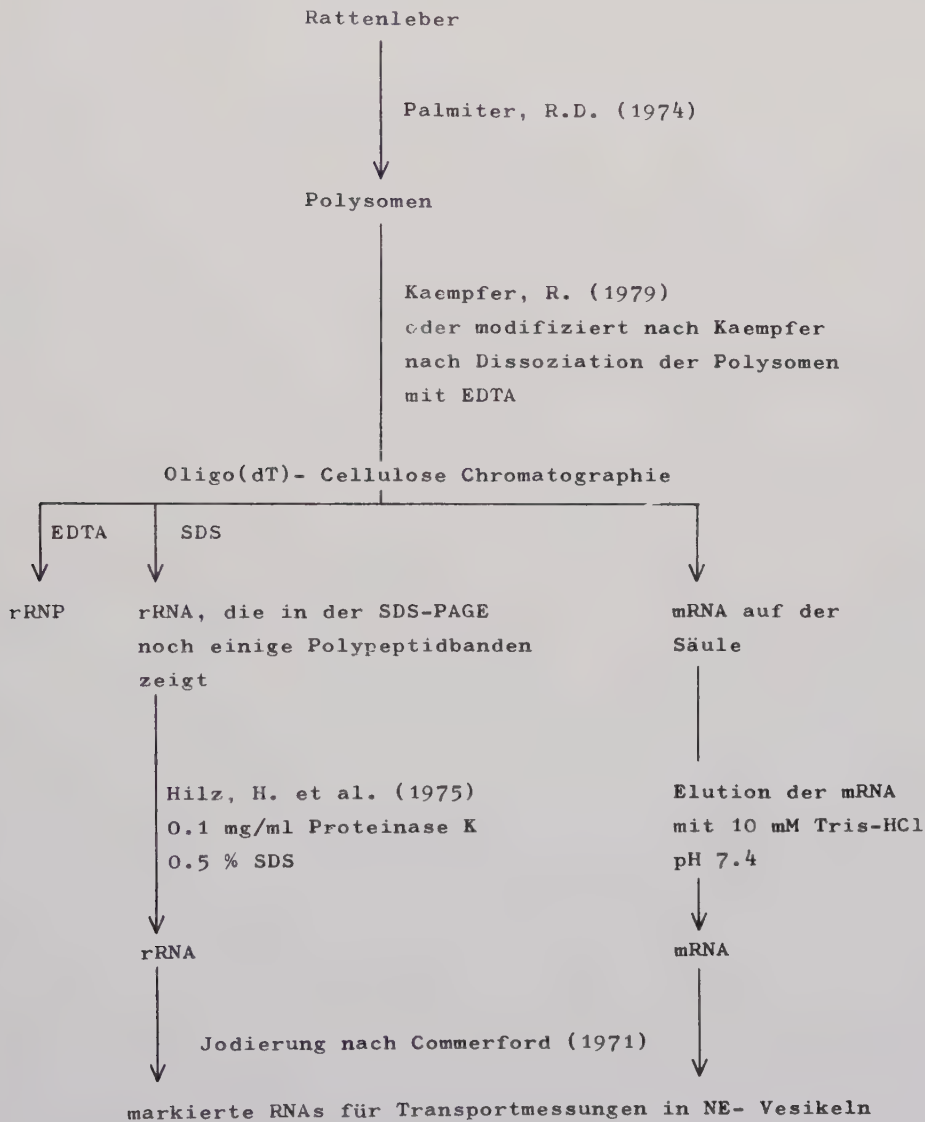


Abb.28 Präparationsschema der verschiedenen Ribonukleinsäuren

Alle verwendeten Puffer wurden autoklaviert, wenn sie Saccharose enthielten, wurden sie wie von Palmiter beschrieben mit

Diethylpyrocarbonat vorbehandelt. Alle Glasgeräte wurden über Nacht bei 180°C im Trockenschrank sterilisiert. Die Polysomen wurden modifiziert nach Palmiter (209) dargestellt. Dabei wird die Rattenleber in Anwesenheit von Detergens und dem Ribonuklease-Inhibitor Heparin homogenisiert. Der Zusatz des Detergens schon vor dem Homogenisieren bewirkt eine Erhöhung der Ausbeute an Polysomen und damit an mRNA. Den Nachteil, daß durch das Detergens die Zellorganellen lysiert werden und es dadurch zu Kontaminationen besonders mit lysosomalen Nukleasen kommt, kompensiert man durch den Zusatz hoher Konzentrationen an Heparin. Ohne Heparin als RNase-Inhibitor erhält man nur 10% der Ribosomen. Nach dem Homogenisieren wurde einmal zentrifugiert und die Polysomen aus den vereinigten Überständen durch $MgCl_2$ (Endkonzentration 100 mM) präzipitiert. Nach der Zentrifugation wurde eine hohe Ausbeute an Polysomen erhalten, die sich für die anschließende Affinitätschromatographie sehr gut resuspendieren ließen. Die Oligo(dT)-Zellulose-Chromatographie wurde nach Kaempfer (210) durchgeführt. Dabei wird nur die mRNA wegen der Poly(A)-Sequenz am 3'-Ende an die Oligo(dT)-Zellulose gebunden. Die ribosomalen RNAs wurden aufgefangen und über Nacht mit Proteinase K in Anwesenheit von SDS (204) inkubiert, um alle Polypeptide völlig zu entfernen. Die mRNA wurde mit 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) eluiert und rechromatographiert.

Zur Präparation der rRNP-Fraktion ohne Verwendung von SDS wurden die Polysomen zunächst mit EDTA dissoziiert (211) und dann über die Affinitätschromatographie modifiziert nach Kaempfer (210) die rRNP-Fraktion abgetrennt.

Die Fraktionen wurden mit Ethanol präzipitiert und nach der Zentrifugation in 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) aufgenommen. Ein Teil der rRNA und der mRNA wurden dann gemeinsam mit Hefe-RNA, die zu vergleichenden Messungen eingesetzt wurde, wie von Commerford (212) beschrieben, jodiert.

Abbildung 29 zeigt das Polypeptidmuster der rRNP-Fraktion und als Vergleich die rRNA-Fraktion nach Behandlung mit Proteinase K.

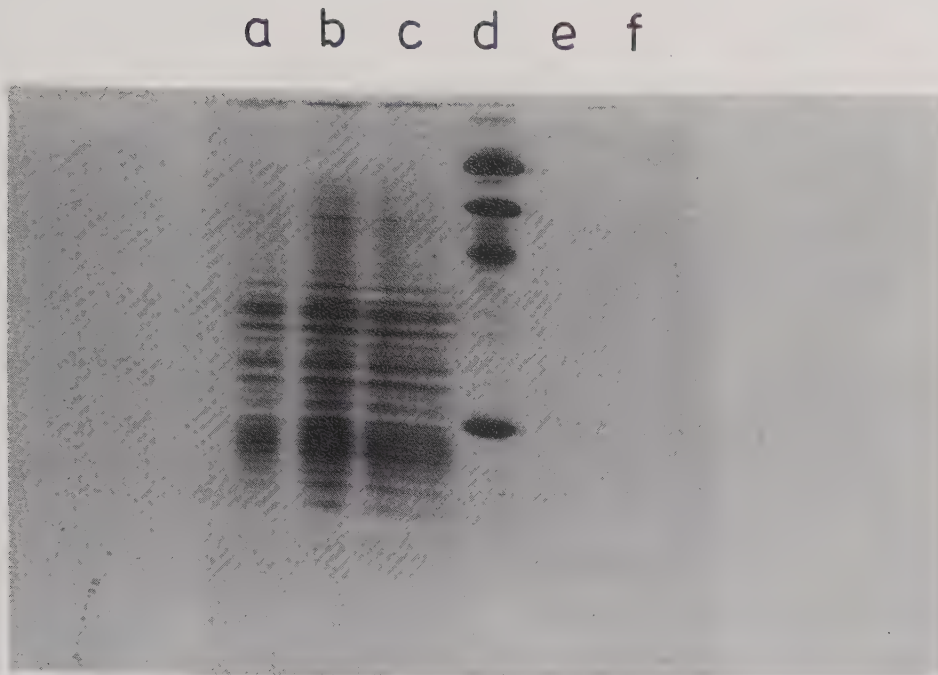


Abb.29 18% Plattengel der Polypeptide der mittels EDTA präparierten rRNP-Fraktion. Die mit Proteinase K inkubierte rRNA-Fraktion weist keine Polypeptidbanden mehr auf.

a, b, c = 25 µg, 50 µg bzw. 75 µg der rRNP-Fraktion;
e, f = 50 µg bzw. 75 µg der rRNA-Fraktion;

d = MG-Standards: Phosphorylase b MG 97 400, Rinder-serumalbumin MG 68 800, Ovalbumin MG 44 600 und Trypsin-Inhibitor MG 20 100.

Die aufgetragenen Mengen basieren auf der Messung der Absorption bei 260 nm, wobei 1 OD₂₆₀ 40 µg RNA entspricht (213).

2.6.2.2. Effekt von Hefe-RNA, rRNP, rRNA und mRNA auf die ATPase-Aktivität von NE-Vesikeln und DNase-NES

In diesen Versuchen wurden zunächst NE-Vesikel und DNase-NES präpariert und in ATPase-Meßpuffer aufgenommen. Die Suspensionen wurden in Fraktionen aufgeteilt und mit den verschied-

denen RNAs in steigenden Konzentrationen jeweils zehn Minuten vorinkubiert. Anschließend wurde die ATPase-Aktivität gemessen. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 5:

RNA-Zugabe in µg/ml	ATPase-Aktivität in %	
	DNase-NEs	NE-Vesikel
1) Hefe-RNA		
-	100 (Kontrolle)	100 (Kontrolle)
50	116	108
150	138	116
300	146	118
500	148	125
2) rRNP		
-	100	100
50	124	109
150	128	107
300	131	107
500	143	108
3) rRNA		
-	100	100
23	110	101
70	121	104
150	134	103
300	145	109
500	153	107
4) mRNA		
-	100	100
50	105	106
100	118	109
150	130	111
300	142	112
425	142	111

Tab.5 Einfluß verschiedener RNAs auf die ATPase-Aktivität von NE-Vesikeln und DNase-NEs. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 4.

Alle hier eingesetzten RNAs führten zu einer deutlichen Steigerung der ATPase-Aktivität, jedoch nur an den offenen DNase-NEs. Die ATPase-Aktivität war dabei in allen Fällen um etwa 50% stimulierbar, wenn die RNA-Konzentrationen sehr hoch gewählt wurden. Versuche von Agutter et al. (98) und von Bernd et al. (108) zeigen keinen stimulierenden Effekt für rRNA. Das liegt möglicherweise daran, daß die gewählten RNA-Konzentrationen bei 50 µg/ml (98) und etwa 100 µg/ml (108) liegen. Wie die Tabelle zeigt, war der Effekt für diese Konzentrationen auch in den hier durchgeführten Messungen nur gering. Der stimulierende Effekt der RNAs in einer Konzentration von 300 µg/ml bzw. 500 µg/ml ist möglicherweise ein Artefakt, wenn man bedenkt, daß die RNA-Konzentrationen bei einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml viel höher liegen als unter in vivo-Bedingungen.

Die Ergebnisse von Bernd et al. (108), daß nur solche RNAs die ATPase zu stimulieren vermögen, die eine Poly(A)-Sequenz aufweisen, konnten hier nicht bestätigt werden. Von Agutter et al. (98) wurde gezeigt, daß Hefe-RNA in einer Konzentration von 50 µg/ml die ATPase-Aktivität um 25% erhöht, was mit den hier ermittelten Werten vergleichbar ist. Neben Poly(A) haben auch Poly(G) (98,108,116), Poly(A)-Poly(U), Poly(dT), Poly(dA)-Poly(dT), Poly(A)-Poly(dT) und Poly(A)-Poly(U)-Poly(U) (108,116) einen stimulierenden Effekt auf die ATPase. Es wird angenommen, daß die Polynukleotide bzw. RNAs eine bestimmte Tertiärstruktur haben müssen, um die ATPase zu stimulieren (199).

An den NE-Vesikeln konnte keine Stimulation der ATPase für rRNA, rRNP und mRNA gemessen werden. Hefe-RNA hatte einen geringen Effekt, der aber deutlich unter dem für die DNase-NEs lag.

Diese Messungen bestätigen das bereits für Poly(A) gefundene Ergebnis, daß die Vesikel dicht sind und während der Inkubationszeit keine Aufnahme in die Vesikel erfolgt.

Zum Vergleich wurden auch ganze Zellkerne mit Hefe-RNA und mRNA inkubiert und die ATPase-Aktivität gemessen. Die Ergebnisse entsprachen denen für die Vesikel, d.h. es konnte keine Stimulation des Enzyms gemessen werden.

2.6.2.3. Inkubation von Zellkernen und NE-Vesikeln mit radioaktiv markierter Hefe-RNA und mRNA

Bereits die ATPase-Aktivitätstests an den NE-Vesikeln haben gezeigt, daß die verschiedenen RNAs und Poly(A) den NE der Vesikel nicht durchqueren können. Nun wäre es aber durchaus möglich, daß die Inkubationszeit zu kurz war oder aber die Menge an aufgenommener RNA im Inkubationszeitraum zu gering war, um dies über die ATPase messen zu können. Wie die

Fraktion	Inkubationszeit in Minuten	Radioaktivität in %/100 µg Protein			
		Hefe-RNA		mRNA	
		-ATP	+ATP	-ATP	+ATP
Zellkerne	2	0.23	0.30	0.30	0.32
	4	0.23	0.35	0.28	0.31
	6	0.53	0.30	0.29	0.33
	8	0.26	0.29	0.27	0.29
	10	0.25	0.28	0.34	0.30
	15	0.23	0.28	0.27	0.31
	20	0.28	0.29	0.27	0.28
	30	0.26	0.28	0.30	0.30
NE-Vesikel	2	0.44	0.33	0.60	0.62
	4	0.39	0.34	0.58	0.63
	6	0.40	0.34	0.61	0.75
	8	0.42	0.34	0.64	0.66
	10	0.44	0.32	0.62	0.67
	15	0.44	0.35	0.64	0.67
	20	0.41	0.32	0.64	0.62
	30	0.43	0.51	0.68	0.65

Tab.6 Messung der Adsorption von Hefe-RNA und mRNA an Zellkerne und NE-Vesikel in An- und in Abwesenheit von ATP. Die Meßwerte sind Mittelwerte aus zwei Messungen.

Tabelle 5 (siehe 2.6.2.2.) zeigt, ist bei einer Konzentration von 50 µg RNA/ml auch an der ATPase der offenen DNase-NEs nur ein kleiner stimulierender Effekt meßbar. Um zu

untersuchen, ob die RNAs in der Lage sind, den NE zu durchqueren, um aus dem Inkubationsmedium in die Vesikel zu gelangen, wurden die Vesikel mit jodierter Hefe-RNA und mRNA über einen Zeitraum von 30 Minuten mit und ohne ATP inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen, die Vesikel vom Inkubationsmedium abgetrennt und dann die Radioaktivität in den Vesikelpellets gemessen.

Das Ergebnis zeigt Tabelle 6, wobei ganze Zellkerne als Vergleich verwendet wurden. Die ermittelten Werte geben prozentual die aus dem Inkubationsmedium gebundene Menge an RNA wider. Die an die Kerne bzw. Vesikel gebundene Radioaktivität war in An- und in Abwesenheit von ATP sehr gering und keine Zunahme im Verlauf des Meßzeitraumes feststellbar. Die Vesikel wurden deshalb als dicht angesehen, was bedeutet, daß ein Transport von RNA aus dem Inkubationsmedium in die Vesikel nicht stattfindet.

2.6.2.4. Messung des Effluxes von Hefe-RNA, rRNA und mRNA nach dem Einschluß in die NE-Vesikel

Messungen mit verschiedenen kerntypischen und kernuntypischen Proteinen (siehe 2.5.4.) haben gezeigt, daß die NE-Vesikel selektiv nur bestimmte Proteine aufnehmen und akkumulieren, was mit Untersuchungen an Oozyten (64,65) und an HeLa-Zellkernen (171) übereinstimmt. Messungen mit Poly(A) und verschiedenen RNAs (siehe 2.6.1., 2.6.2.2. und 2.6.2.3.) haben gezeigt, daß die ATPase der NE-Vesikel " von außen " nicht stimuliert werden kann, daß die NE-Vesikel gegenüber den RNAs dicht sind, keine Aufnahme erfolgt und daß ein Einschluß in die Vesikel möglich ist. Damit erfüllen die Vesikel die Voraussetzung zur Untersuchung des RNA-Effluxes nach Einschluß in die Vesikel. Hierbei enthält das System noch die für den Translokationsmechanismus notwendigen Komponenten und es sollte untersucht werden, ob der RNA-Efflux auch hier ein regulierter, d.h. mit ATP stimulierbarer Prozeß ist.

Die jodierten RNAs wurden, wie für TPA (siehe 5.3.3.1.)

beschrieben, in die Vesikel eingeschlossen. Nach der Zentrifugation wurden die Vesikel in Transportpuffer gewaschen, in Transportpuffer aufgenommen und in zwei bzw. drei Fraktionen geteilt. Nach Zugabe von ADP bzw. ATP in einer Konzentration von 2 mM wurde bei 22°C der Efflux gemessen.

Die Ergebnisse zeigen Abbildung 30a-c. In allen Fällen kam es auch ohne ATP-Zugabe zu einem Efflux, der jedoch bei der rRNA nur sehr gering war. Ein ATP-Effekt war nur bei der Messung des mRNA-Effluxes deutlich sichtbar. Während beim Efflux der Hefe-RNA nach der Zugabe von ATP die Radioaktivität im Überstand um etwa 13% zunahm, war die Zunahme bei der rRNA nur etwa 6%. Beim mRNA-Efflux hingegen war mit ATP eine etwa 100%-ige Steigerung des Transportes meßbar. Wie die Abbildung 30c weiter zeigt, war der mRNA-Efflux auch mit ADP etwas stimulierbar. Wie bereits erwähnt, hat die NE-ATPase eine sehr breite Substratspezifität (97,99,100). So wurde von Clawson et al. (100) beschrieben, daß der RNA-Efflux auch durch Zugabe von ADP induziert werden kann, wobei ADP offenbar durch eine Myokinase-ähnliche Reaktion, die sowohl an isolierten Zellkernen (214) als auch an isolierten NEs (100) zu finden ist, zu ATP phosphoryliert wird.

Im Gegensatz zu den hier durchgeführten Effluxmessungen findet man bei den an isolierten Zellkernen durchgeführten Messungen häufig einen nur sehr geringen Efflux von mRNA in Abwesenheit von ATP (109-111), wenngleich dieser bei einer Inkubation bei 30°C zunimmt (97,104,110). Von Agutter (215) wurden die in der Literatur veröffentlichten Transportmedien zur Messung des mRNA-Effluxes aus Zellkernen verglichen.

Diese Medien sind teilweise sehr komplex und enthalten z.B. Spermidin, Sulfhydrylreagentien, Hefe-RNA, zytoplasmatische Proteine, $MnCl_2$ und ein ATP-regenerierendes System (siehe (215)) Bei der Bewertung der Qualität der Transportmedien sind die Charakterisierung der transportierten RNA, die freigesetzte DNA-Menge und die Morphologie der Zellkerne berücksichtigt worden. Dabei zeigte sich, daß in einfachen Medien (die nur Tris-HCl pH 7.6, Saccharose, KCl und $MgCl_2$ enthielten) auch ohne ATP ein beträchtlicher Efflux meßbar ist. $CaCl_2$, $MnCl_2$, zytoplasmatische Proteine und ganz

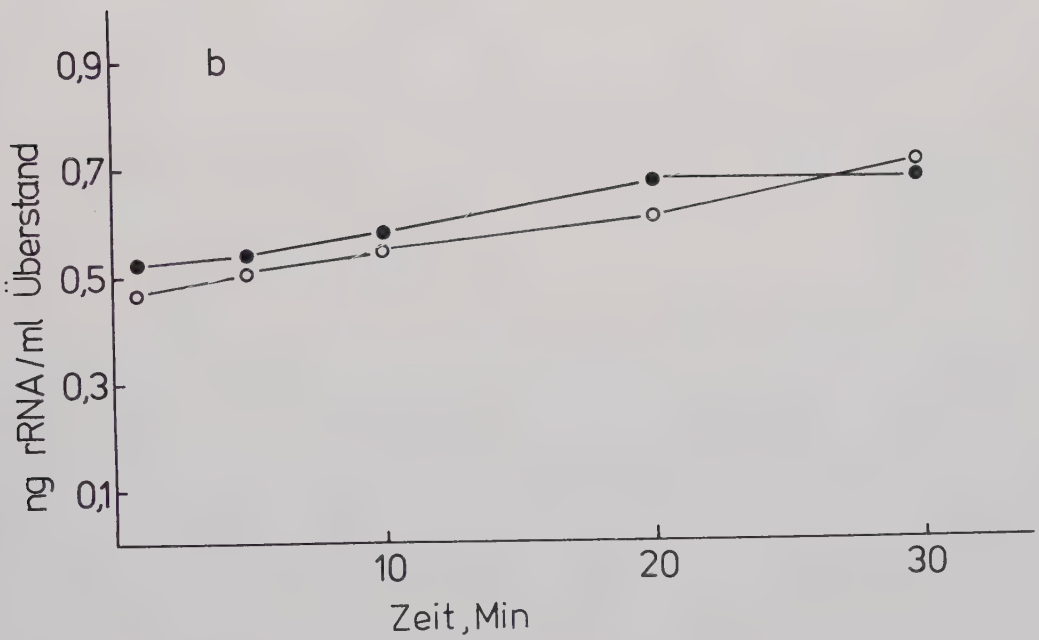
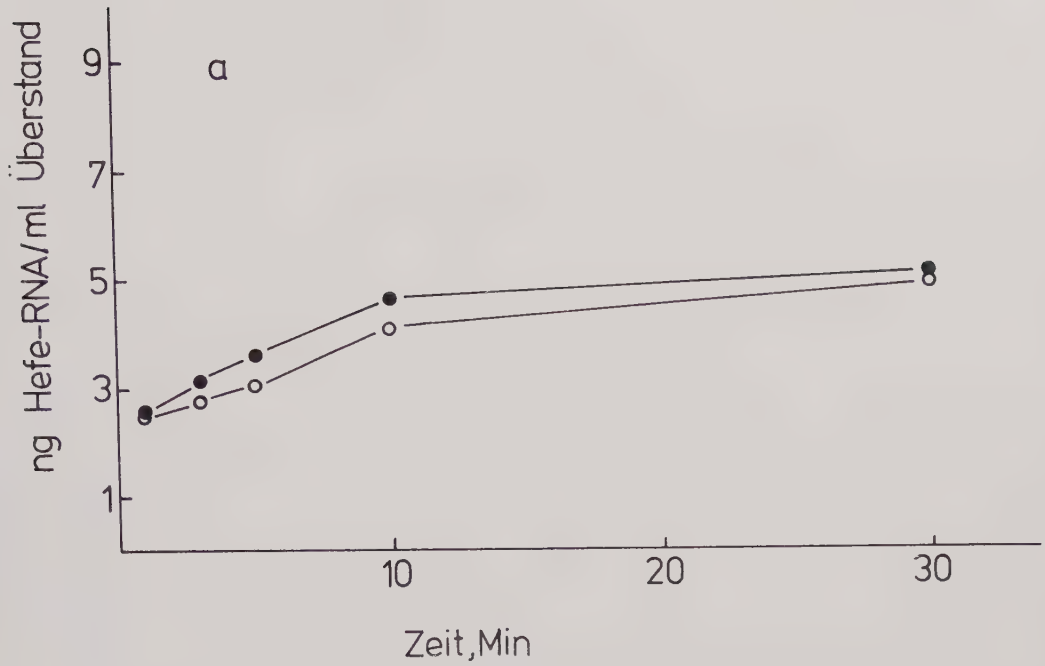


Abb.30a Efflux von Hefe-RNA aus NE-Vesikeln in Abwesenheit von ATP (○) und in Anwesenheit von 2 mM ATP (●).

Abb.30b Efflux von rRNA aus NE-Vesikeln in Abwesenheit von ATP (○) und in Anwesenheit von 2 mM ATP (●).

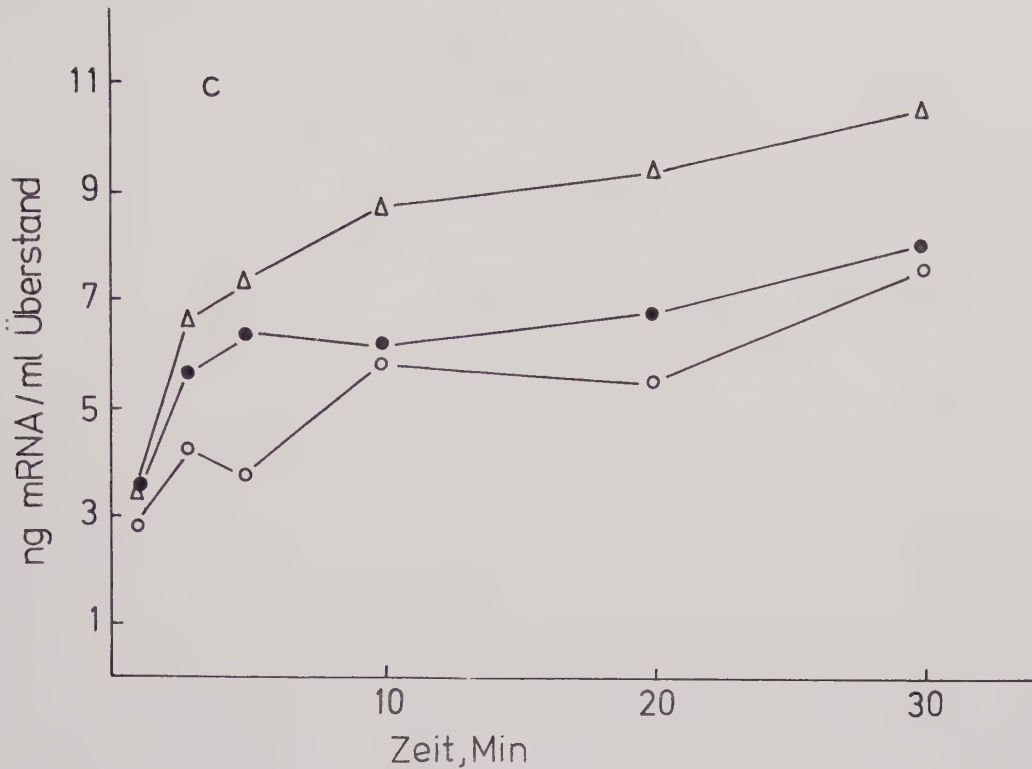


Abb. 30c Efflux von mRNA aus NE-Vesikeln in Abwesenheit von ATP und ADP (○) und in Anwesenheit von 2 mM ADP (●) bzw. 2 mM ATP (Δ).

besonders Spermidin stabilisieren die Zellkerne und verhindern ein Platzen der Kerne, was durch freigesetzte DNA angezeigt würde. Die Untersuchungen zeigten, daß ein Transportmedium für Zellkerne zumindest aus den Komponenten Tris, 2-Merkaptoethanol, Spermidin, $MgCl_2$, $CaCl_2$, $MnCl_2$ und HeferRNA bestehen muß. Andererseits ist es sehr wichtig, ein einfaches, adäquates Medium zu wählen, um den Mechanismus, der dem mRNA-Transport zugrunde liegt, ohne Beeinträchtigung durch unkontrollierbare Faktoren untersuchen zu können (215).

Das hier gewählte Transportmedium besteht aus den Komponenten Tris, NaCl, KCl und $MgCl_2$. Es ist viel weniger komplex als das für ganze Zellkerne. Außerdem ist der mRNA-Efflux an einer Struktur meßbar, die ausschließlich aus Komponenten der Kernperipherie besteht, in der der Transportmechanismus

lokalisiert ist. Somit ist mit den NE-Vesikeln erstmals eine Subfraktion von Zellkernen beschrieben, die zu einem regulierten Transport von mRNA fähig ist. Die Einfachheit des Systems ist dabei eine sehr wichtige Voraussetzung zur weiteren Charakterisierung dieses Transportprozesses.

3. DISKUSSION

Der NE unterteilt die Zelle in ihre beiden Hauptkompartimente. Diese Unterteilung macht den Austausch von Makromolekülen zwischen dem Kompartiment der Transkription und dem der Translation erforderlich. Dieser Austausch erfolgt entlang des NE. Der NE ist in der Lage, zelluläre Prozesse wie die Proteinbiosynthese und die Genexpression zu regulieren (und zwar durch eine Kontrolle des RNA-Transportes). Eine Vielzahl von Untersuchungen zeigt, daß der Transport entlang des NE durch die Porenkomplexe stattfindet. Während diese Porenkomplexe in ihrer Ultrastruktur sehr gut untersucht sind (58,60), konnten die Komponenten des NEs bzw. der Porenkomplexe, die in die Transportvorgänge involviert sind, bisher nicht direkt identifiziert werden. Die Proteine, die am Aufbau der Porenkomplexe beteiligt sind und die Polypeptide, die am Transport von RNP teilhaben, sind bis auf wenige Ausnahmen (61,62) unbekannt. Während eine große Zahl von Untersuchungen die Aufklärung der Ultrastruktur und die Subfraktionierung des NE zum Ziel haben, sind Messungen des Proteintransportes entlang des NE in isolierten Säugerzellkernen bisher kaum durchgeführt worden. So wurde von Cox (171) die Aufnahme von verschiedenen Proteinen in isolierte HeLa-Zellkerne gemessen, während alle übrigen Messungen auf Mikroinjektionsexperimenten an Oozyten beruhen (64,65,70,72, 74,76,79).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, den Transport von Proteinen entlang des NE mit Hilfe von NE-Vesikeln aus Rattenleberzellkernen zu charakterisieren. Eine wichtige Vorbedingung ist, daß die Vesikel für solche Messungen geeignet sind. Sie sollten dicht sein und auch die für den Transport als notwendig angesehenen Komponenten enthalten.

Mit einer Modifizierung der Methode von Bornens und Courvalin (140) zur Darstellung von NEs konnte eine Methode zur Präparation von NE-Vesikeln entwickelt werden. Zum Nachweis des vesikulären Charakters wurden biochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt:

Mit Hilfe eines ATP-Analogons, von dem bekannt war, daß es

den NE von Leberzellkernen nicht zu durchqueren vermag (4), wurde gezeigt, daß eine Hemmung der ATPase der NE-Vesikel nicht möglich war. Dieses Ergebnis entsprach den Messungen an ganzen Zellkernen und stand im Gegensatz zu den Messungen an weitgehend offenen, mittels DNase I dargestellten NEs (142), wo unter gleichen Bedingungen eine 50%-ige Hemmung der ATPase erfolgte. Nachdem es experimentell gelungen war, das ATP-Analogon während der Präparation in die Vesikel einzuschließen und hieraus eine deutliche Hemmung der ATPase resultierte, war die ATPase als ein Enzym identifiziert, daß auf der Innenseite des NE der Vesikel lokalisiert ist, was frühere Messungen (4) bestätigte. Die Messungen mit dem ATP-Analogon gaben einen ersten Hinweis darauf, daß die Präparation zu mehr als 85% aus Vesikeln besteht.

Im Transmissions-Elektronenmikroskop bestätigte sich diese Annahme, auch hier waren mehr als 85% der NEs als geschlossen zu erkennen. Die Versuche, die Vesikel auch im Raster-Elektronenmikroskop darzustellen, erwiesen sich zunächst als sehr schwierig, weil die empfindlichen vesikulären Strukturen bei der Methode der Critical-Point-Trocknung leicht zerstört wurden und aufgrund ihrer geringen Elektrodichte nur schlecht darstellbar waren. Eine Lösung dieses Problems wurde gefunden, nachdem es möglich war, die Vesikel während ihrer Präparation mit Ferritin zu beladen. Mit der Beladung mit radioaktiv markiertem Ferritin und der anschließenden Inkubation konnte gezeigt werden, daß die Vesikel über einen langen Zeitraum stabil sind.

Untersuchungen der Polypeptide der NE-Vesikel zeigten, daß die für die PCL-Fraktion charakteristischen Banden im Bereich des MG's von 70 000 vorhanden sind. Dies war auch zu erwarten, denn diese Fraktion des NE ist gegenüber allen bisher eingesetzten Subfraktionierungsmethoden resistent (142). Mit Versuchen, die NE-Vesikel unter Verwendung der bereits bekannten Methoden (4,142,148) weiter zu subfraktionieren, konnten nach einer Extraktion mit 1 M NaCl und einer anschließenden Extraktion mit 4 M Harnstoff die Banden der PCL-Fraktion etwas angereichert werden. Hier liegt

eventuell ein guter Ansatzpunkt zur Anreicherung von Polypeptiden der Porenkomplexe, da diese selektiv in Abhängigkeit der Harnstoffkonzentration aus den NEs extrahiert werden können (148), die dann aber deutlich unter 4 M liegen muß.

Nach der Charakterisierung der NE-Vesikel wurde zunächst die Aufnahme von kerntypischen Proteinen wie Histonen, HMG-Proteinen und sauren chromosomalen Proteinen gemessen. Die Histone wurden sehr schnell von den Vesikeln aufgenommen und akkumuliert. Dies wurde schon vorher an verschiedenen anderen Zellsystemen (65,70,170) und an isolierten HeLa-Zellkernen (171) gemessen. Eine Bestimmung der Sättigung der Histonaufnahme ergab eine unerwartet hohe Aufnahmekapazität, ein Phänomen, das ebenfalls an Oozyten-Kernen nach Mikroinjektion von Histonen beobachtet wurde (65). Die Aufnahme von Histonen konnte durch eine Reihe von Nukleotiden stimuliert werden, am besten durch GTP und GDP. Dennoch ist dies kein Effekt eines aktiven Transportes, denn die Aufnahme wurde auch durch Guanosin-5'-($\beta\gamma$ -methylen)-Triphosphat stimuliert. Die Aufnahme von Proteinen in vitro ist unabhängig von metabolischer Energie (171).

Die Histone werden selektiv an intravesikuläre Komponenten (besonders DNA) gebunden. Untersuchungen mit HMG-Proteinen nach Vorinkubation mit Histonen lieferten Hinweise, daß die Histone geordnete, vielleicht Nukleosomen ähnliche Strukturen bilden.

Versuche mit kernuntypischen Proteinen zeigten, daß die Vesikel selektiv nur zu Kernproteinen eine hohe Affinität haben. Die Messungen stimmen gut überein mit Untersuchungen an Oozyten (64,65,75-77) und HeLa-Zellkernen (171). Besonders auffallend war die völlig fehlende Affinität zu Cytochrom c, einem ebenfalls kleinen, basischen Protein. Damit war gezeigt, daß die Vesikel spezifisch Kernproteine aufnehmen und akkumulieren können.

Durch die gute Übereinstimmung der Messungen an diesem in vitro-System mit den Ergebnissen an den in vivo-Systemen

wurde versucht, auch den RNA-Efflux in diesem System zu untersuchen. Dabei wurde zunächst die Abhängigkeit der ATPase-Aktivität von verschiedenen RNAs ermittelt. Als Vergleich diente wiederum die ATPase der DNase-NEs. Die Versuche zeigten, daß eine Zugabe von RNAs nur an den offenen NEs zu einer deutlichen Stimulation führte, während an den Vesikeln " von außen " kein Effekt zu messen war. Auch diese Messungen zeigten eindeutig, daß die Vesikel dicht sind, was nach einer Inkubation mit radioaktiv markierter Hefe-RNA und mRNA bestätigt wurde. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Agutter et al. (98) und Bernd et al. (108) war die ATPase auch durch rRNA und rRNP stimulierbar. Möglicherweise war dies ein Artefakt, beruhend auf den sehr hoch gewählten Konzentrationen an rRNA bzw. rRNP. Andererseits würde man erwarten, daß auch die rRNA einen stimulierenden Effekt hat, wenn als Grundvoraussetzung eine bestimmte Tertiärstruktur der RNA gilt (199). Mit den Ergebnissen von Bernd et al. (108), daß die RNA zur Stimulation der ATPase eine Poly(A)-Sequenz (mRNA) haben muß, stimmen auch Ergebnisse nicht überein, nach denen auch Hefe-RNA die ATPase zu stimulieren vermag (98,198).

Die meisten Untersuchungen zum RNA-Transport aus Zellkernen befassen sich mit dem Transport von mRNA (97,100,109-111, 115,123,215) und zeigen eindeutig, daß dieser Transport ATP-abhängig ist. Im Gegensatz dazu ist der Transport von rRNP ATP-unabhängig (113,114). Es wurden rRNA und mRNA präpariert und in die Vesikel eingeschlossen, um zu untersuchen, ob der Efflux auch hier ein regulierter Prozeß ist. Die Messungen zeigten, daß nur der mRNA-Efflux durch Zugabe von ATP deutlich erhöht werden konnte. Die Vesikel enthalten somit neben der ATPase auch den Transportmechanismus für mRNA, der in der Peripherie des NE lokalisiert sein muß. Mit diesen Messungen ist erstmals ein regulierter mRNA-Efflux in einem System beschrieben, das eine Subfraktion des Zellkerns darstellt. Ein Nachteil der Meßmethode liegt jedoch darin, daß zum Beladen der Vesikel experimentell bedingt hohe Konzentrationen an mRNA nötig sind, da nur etwa 3% der mRNA von den Vesikeln aufgenommen werden.

Wie schon erwähnt, sind die am Transport beteiligten Komponenten weder exakt ultrastrukturell lokalisierbar noch biochemisch charakterisiert. Trotz der geringen biochemischen Kenntnisse ist aus einer Vielzahl von Einzelergebnissen ein Modell erstellt worden, daß den Mechanismus des mRNA-Transportes zu beschreiben versucht. Dieses Modell ist von Agutter (115) entwickelt und von Bachmann et al. (216) erweitert worden. Es ist eine Modifikation des allgemeinen Schemas von Hill (217):

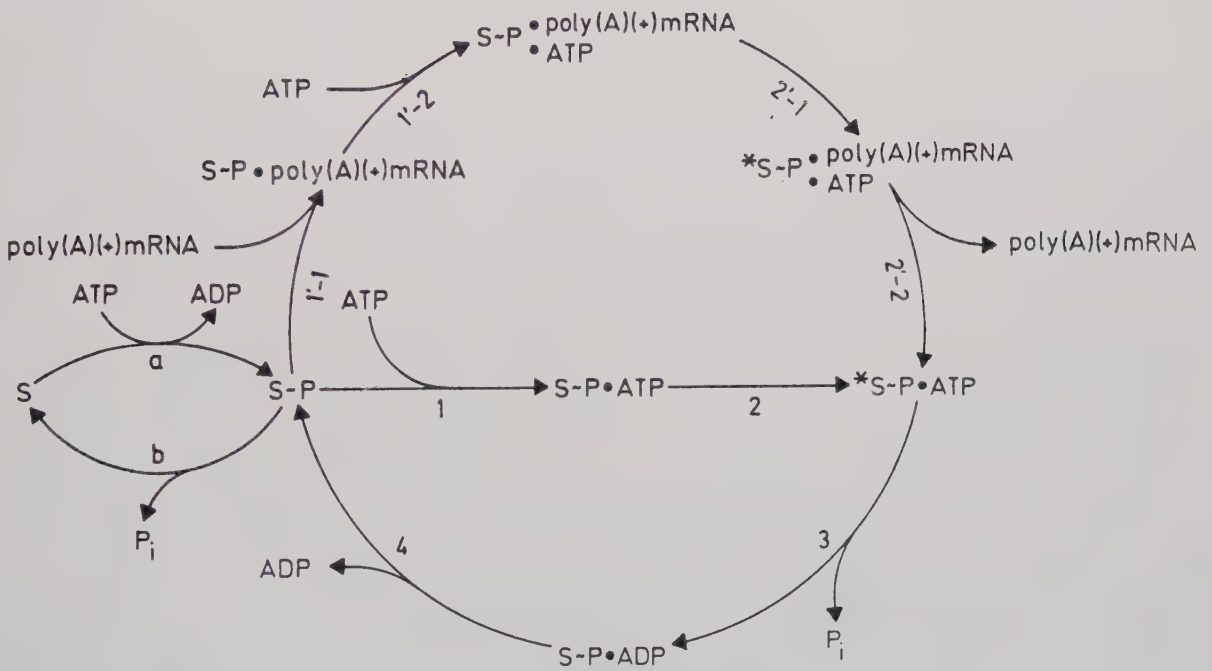


Abb.31 Schema des durch die NE-ATPase vermittelten mRNA-Transportes durch die Kernporen

In Schritt 1 bindet ATP an den phosphorylierten Carrier $S-P$, wodurch es zu einer Konformationsänderung von $S-P-ATP$ zu $S^*-P-ATP$ kommt (Schritt 2). Unter Abspaltung von P_i aus dem ATP (Schritt 3) kommt es wieder zu einer Konformationsänderung von S^*-P zu $S-P$. ADP hat eine geringe Affi-

nität zum Carrier und diffundiert ab (Schritt 4). Die Reaktionsgeschwindigkeit dieses ATPase-Zyklus kann durch Kopplung mit Poly(A)(+)mRNA beschleunigt werden. Dabei bindet Poly(A)(+)mRNA bevorzugt an den phosphorylierten Carrier (Schritt 1'-1). Unter Bindung von ATP (Schritt 1'-2) kommt es wieder zu einer Konformationsänderung des Carriers von S-P zu S^{*}-P (Schritt 2'-1), wodurch eine Freigabe der Poly(A)(+)mRNA erfolgt (Schritt 2'-2). Beim Transport der Poly(A)(+)mRNA ist dabei keine Dephosphorylierung des Carriers erforderlich. Die Phosphorylierung (Schritt a) und die Dephosphorylierung (Schritt b) des Carriers sind unabhängige Reaktionen und modulieren lediglich die Affinität des Carriers zu Poly(A)(+)mRNA und ATP.

Da der Durchmesser eines mRNP-Komplexes mit etwa 20 nm (96) viel größer ist als der Durchmesser der Poren, der bei 9 nm liegt (66), stellt man sich vor, daß die RNA-Kette, die auf der Oberfläche des RNP-Partikels verläuft, sich in kleinen lokalen Regionen zunächst auffalten muß. Diese entfaltete, lineare Sequenz der RNA wechselwirkt dann mit dem Translokationsmechanismus, der die ATPase enthält. Die RNA-Kette wird dann mit den assoziierten Protein-Domänen durch die Pore geschleust, wobei pro Nukleotid eine energiereiche Phosphatbindung hydrolysiert werden muß. Schließlich faltet sich die RNA-Kette außerhalb des NE wieder in die vorherige Raumstruktur zurück. Der Translokationsmechanismus erkennt vor allem spezifische Konformationen der RNA (96).

Die zum Transport von mRNA fähigen NE-Vesikel können einen wichtigen Beitrag zur Erforschung des Transportmechanismus leisten. So kann man z.B. zur Untersuchung der Frage, ob die für den Transport entscheidende Sequenz der Poly(A)-Teil ist, Poly(A) gemeinsam mit Poly(A)-freien RNAs inkorporieren und messen, ob der Carrier nun die RNA transportiert. Mit radioaktiv markiertem Poly(A) könnte man untersuchen, ob mit der Stimulation der ATPase ein Transport aus den Vesikeln einhergehen muß oder ob die ATPase auch ohne Kopplung an einen Carrier arbeitet. Auch mRNAs, die keine Poly(A)-

Sequenz aufweisen (218), müssen von dem Transportmechanismus erkannt werden. Die RNA verursacht auch keine allosterische Änderung der ATPase (98).

Daneben kann man untersuchen, ob die aus nur 100-200 Nukleotiden bestehenden snRNAs, denen man eine Funktion bei der Reifung der mRNA zuschreibt (219), spezifisch an NE-Komponenten gebunden werden und ob sie überhaupt transportiert werden. Diese "wiederverwendbaren" snRNAs können offenbar zwischen Kern und Zytoplasma pendeln, sind also zum Wiedereintritt in den Kern fähig (220).

Die NE-Vesikel sind in ihrem Aufbau sehr viel weniger komplex als die ganzen Zellkerne. Sie zeigen eine ausschließliche Beteiligung des NE am Transport und auch die Anforderungen, die sie an das Transportmedium stellen, sind sehr viel geringer. Bei der Erforschung des Transportsystems und des Translokationsmechanismus sind aber die Chancen einer Isolierung und Charakterisierung der beteiligten Komponenten um so größer, je einfacher das Testsystem ist.

4. ZUSAMMENFASSUNG

Mit biochemischen und elektronenmikroskopischen Methoden konnte gezeigt werden, daß die mittels Heparin aus Zellkernen darstellbaren NEs zu etwa 85% Vesikel bilden. Sie enthalten die für die Porenkomplex-Lamina-Fraktion typischen Polypeptide.

Mit einem ATP-Analogon und verschiedenen RNAs konnte gezeigt werden, daß der NE dieser Vesikel ebenso orientiert ist wie in ganzen Zellkernen und daß die NE-Vesikel dicht sind.

In den NE-Vesikeln konnte die ATPase, die an nukleozytoplasmatischen Transportvorgängen beteiligt ist, gegenüber ganzen Zellkernen beträchtlich angereichert werden.

Die Aufnahmemessungen von Kernproteinen und Nicht-Kernproteinen in die Vesikel zeigten, daß die Vesikel spezifisch zu Kernproteinen eine hohe Affinität haben und diese selektiv akkumuliert werden. Die Aufnahme von Histonen konnte durch GTP und GDP stimuliert werden. Die Messungen weisen darauf hin, daß die Histone in den NE-Vesikeln geordnete Aggregate bilden.

Nach Einschluß verschiedener RNAs in die NE-Vesikel konnte gezeigt werden, daß der Efflux von mRNA durch ATP stimulierbar ist. Damit ist erstmals eine Subfraktion von Zellkernen beschrieben, die einen regulierten mRNA-Transport zeigt. Die Einfachheit dieses Meßsystems kann es zu einem wichtigen Hilfsmittel bei der Erforschung des Transportmechanismus für RNAs aus dem Zellkern machen.

5. EXPERIMENTELLER TEIL

5.1. Darstellung der Zellkerne

Alle Experimente wurden mit männlichen Sprague-Dawley Ratten durchgeführt (Gewicht 200-250 gr). 24 Stunden vor der Tötung erhielten die Tiere nur noch Wasser, damit die Glykogenreserven abgebaut wurden. Getötet wurden die Ratten durch Ätherüberdosis oder Durchtrennung der Halswirbel. Die Präparation wurde modifiziert nach Blobel und Potter (129) durchgeführt. Die Leber wurde rasch herausgeschnitten und in mehreren Volumen 0.25 M STKMC-Puffer (0.25 M Saccharose, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 25 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 3.3 mM $CaCl_2$) gekühlt. Die weitere Präparation wurde in der Kühlkammer durchgeführt. Die Leber wurde gewogen, fein zerschnitten, in 2 Volumen 0.25 M STKMC-Puffer aufgenommen, im Potter-Homogenisator homogenisiert und durch 4 Lagen Mullgaze filtriert. Das Filtrat wurde 10 Min. bei 2 000 x g zentrifugiert. Die Pellets wurden in 0.25 M STKMC-Puffer so homogenisiert, daß pro Gramm Leber ein Milliliter Puffer eingesetzt wurde. Dann wurde mit 2.3 M STKMC-Puffer (2.3 M Saccharose, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 25 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 3.3 mM $CaCl_2$) auf das 4.5-fache Volumen des 0.25 M STKMC-Puffers aufgefüllt, durchmischt, mit 5 ml 2.3 M STKMC-Puffer unterschichtet und 75 Min. bei 96 000 x g im Beckman SW 27 Rotor zentrifugiert. Die oben liegende Schicht aus Fett, ER und Mitochondrien wurde vorsichtig mit einem Spatel abgelöst und mit dem Überstand ausgeschüttet. Danach wurden die Zentrifugenröhrchen mit Papier gereinigt und die Kernpellets 3 x in 0.25 M STKMC-Puffer gewaschen.

Die Ausbeute wurde durch Bestimmung der Absorption bei 260 nm ermittelt.

1 Gramm Leber ergaben etwa 25 OD_{A260} , wobei 1 OD etwa 66 μg Protein und 3×10^6 Kernen entspricht (11). Die quantitative Bestimmung des Proteins erfolgte immer nach Lowry (147).

5.1.1. Kontrolle der Präparation der Zellkerne im Lichtmikroskop

Die Zellkerne wurden zunächst mit Kernechtrot oder Cresylechtviolett gefärbt und waren dann im Lichtmikroskop tiefrot bzw. violett erkennbar.

1 Tropfen Kernsuspension und 1 Tropfen der Färbelösung wurden auf einem Objektträger ausgestrichen und nach 10 Min. im Lichtmikroskop betrachtet.

Färbelösungen:- Kernechtrot: 0.1 gr in 100 ml 5%-iger Aluminiumsulfatlösung.

- Cresylechtviolett (Chroma-Gesellschaft Schmid GmbH & Co Stuttgart): 0.1%-ig in Wasser; die Lösung wird mit 10%-iger Essigsäure angesäuert und muß eine Temperatur von 42°C haben.

5.2. Darstellung von NEs

5.2.1. Darstellung von NEs mittels DNase I

Diese NEs wurden modifiziert nach Dwyer und Blobel (142) dargestellt. Je 100 OD_{A260} eines Kernpellets wurden in 1 ml 0.1 mM MgCl₂-Lösung resuspendiert, gefolgt von der schnellen Zugabe von 7.5 µl DNase I-Lösung (1 mg DNase I/ ml 0.25 M STKMC-Puffer) und 4 ml 10% STM-Puffer (10% Saccharose (wt/v), 10 mM Tris-HCl pH 8.5, 0.1 mM MgCl₂). Die Suspension wurde 15 Min. bei 22°C inkubiert, mit 1 ml 30% STM-Puffer (30% Saccharose (wt/v), 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1 mM MgCl₂) unterschichtet und 15 Min. bei 23 000 x g bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml 10% STM-Puffer pH 7.4 resuspendiert und nach Zugabe von 7.5 µl DNase I-Lösung 20 Min. bei 22°C inkubiert. Dann wurde erneut mit 1 ml 30% STM-Puffer unterschichtet und bei 23 000 x g bei 4°C zentrifugiert, wobei die DNase-NEs pelletierten.

Ausbeute: 10 mg Kernprotein lieferten etwa 2 mg DNase-NE-Protein.

5.2.2. Darstellung von NE-Vesikeln mittels Heparin

Heparin-NEs wurden modifiziert nach Bornens und Courvalin (140) dargestellt. Die Zellkerne wurden so in TP-Puffer (10 mM Tris-HCl, 10 mM Na_2HPO_4 ; pH 8.0) rehomogenisiert, daß die DNA-Konzentration 200 $\mu\text{g/ml}$ betrug. Dann wurde die 1.5-fache Menge an Heparin (Liquemin 25 000; Hoffmann-La Roche) bei 22°C zugegeben und etwa 4 Min. bei 22°C auf dem Magnetrührer gerührt. Bei einer Inkubation mit Heparin bis zu 40 Min. konnte keinerlei Unterschied zwischen den NEs gefunden werden. Die Wirkung von Heparin ist somit innerhalb weniger Minuten abgeschlossen (140). Die Suspension wurde anschließend durch Nylon-Watte (scrubbed Nylon fiber, 3 denier, 3.81 cm, type 200, Fenval-Laboratories) filtriert und max. 40 Min. bei 4°C und 45 000 x g im Sorvall SS 34 Rotor zentrifugiert. Das Pellet wurde 2 x in 0.25 M STKMC-Puffer gewaschen und dann je nach Experiment in einem entsprechenden Puffer rehomogenisiert.

Ausbeute: 10 mg Kernprotein lieferten etwa 3 mg NE-Vesikelprotein.

5.2.3. Bestimmung des DNA-Gehaltes der NEs

Die Bestimmung des DNA-Gehaltes erfolgte modifiziert nach Burton (145). Die zu analysierenden Proben wurden mit 0.5 N HClO_4 angesäuert, bis die Konzentration an HClO_4 0.25 N war. Das Endvolumen betrug dabei stets 6 ml. Die Suspension wurde entweder 1 x 30 Min. oder 2 x 20 Min. im Eisbad gerührt, um die RNA zu entfernen. Anschließend wurde bei 15 000 rpm in der Sorvall-Zentrifuge in einem SS 34 Rotor zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Pellets in 0.5 ml 0.5 N HClO_4 mit einem Glasstab resuspendiert. Die Suspension wurde nach Zugabe von 1 ml 0.5 N HClO_4 für 15 Min. bei 70°C erhitzt und dann zentri-

fugiert. Die DNA-haltigen Überstände wurden gesammelt und die Pellets erneut mit 1.5 ml 0.5 N HClO_4 für 15 Min. bei 70°C extrahiert. Die vereinigten Überstände dienten zur Bestimmung des DNA-Gehaltes.

1 ml Überstand und eine 1:2- bzw. eine 1:5-Verdünnung des Überstandes in 0.5 N HClO_4 (Endvolumen je 1 ml) wurden mit 2 ml Diphenylaminreagenz (1.5 gr Diphenylamin in 100 ml Eisessig, dazu 1.5 ml konzentrierte Schwefelsäure. Unmittelbar vor Gebrauch gibt man 0.1 ml 1.6%-ige Acetaldehydlösung zu 20 ml Diphenylaminreagenz) gemischt. Die Mischung wurde 17-20 Stunden bei 30°C im Thermostat inkubiert. Dann wurde die Blaufärbung bei 600 nm gegen einen Leerwert gemessen. Zur Eichung diente eine DNA-Stammlösung (DNA aus Kalbsthymus, Typ 1, Natriumsalz, Sigma No D-1501), wobei die DNA durch Erhitzen für 15 Min. bei 70°C in 0.5 N HClO_4 gelöst wurde.

5.2.4. Subfraktionierung der NE-Vesikel

Hierzu wurden zunächst die NE-Vesikel, wie unter 5.2.2. beschrieben, präpariert. Nach dem Waschen in 0.25 M STKMC-Puffer wurden die Vesikel so in 0.25 M STKMC-Puffer resuspendiert, daß die Proteinkonzentration 2 mg/ml betrug. Die Suspension wurde durch Zugabe von 1/20 Volumen einer 20%-igen Triton X-100 Stammlösung 1%-ig gemacht und in Analogie zu der Vorschrift von Dwyer und Blobel (142) 10 Min. im Eisbad inkubiert. Anschließend wurde 10 Min. bei 4°C mit 20 000 x g in der Sorvall-Zentrifuge zentrifugiert und der Triton X-100-Überstand vorsichtig entfernt. Das Pellet wurde in einem Puffer aus 10 mM Tris-HCl pH 7.5 und 1 M NaCl resuspendiert, auf 2 mg/ml eingestellt und wieder entsprechend der Vorschrift von Dwyer und Blobel (142) 10 Min. im Eisbad inkubiert. Die anschließende Zentrifugation bei 20 000 rpm lieferte einen histonhaltigen Überstand, der eine Vielzahl anderer Polypeptide enthielt (siehe Gel in 2.2.3.). Das Pellet wurde dann wie von Kondor-Koch (4) beschrieben, mit 4 M Harnstoff extrahiert, indem es in einem Puffer aus 10 mM Tris-HCl pH 7.5 und 4 M Harnstoff auf

2 mg/ml eingestellt und 10 Min. bei 37°C inkubiert wurde. Die anschließende Zentrifugation bei 20 000 x g für 10 Min. im SS 34 Rotor sollte einen mit PCL-Polypeptiden angereicherten Überstand liefern. Zum Vergleich wurde eine Kernsuspension, die ebenfalls mit 0.25 M STKMC-Puffer auf 2 mg/ml eingestellt war, direkt mit Triton X-100 und dann mit 10 mM Tris-HCl pH 7.5/4 M Harnstoff, wie für die Vesikel beschrieben, inkubiert.

Alle Fraktionen wurden gegen 10 mM Tris-HCl pH 7.5 dialysiert, lyophilisiert und dann für die Analyse in der SDS-PAGE in Probenpuffer (siehe 5.7.) aufgenommen.

Bei den Versuchen zur Solubilisierung der NE-ATPase mittels Triton X-100 (siehe 2.3.1.2.) wurde ebenfalls die hier beschriebene Methode angewendet.

Zur Solubilisierung der NE-ATPase mit einer Kombination aus Detergens und hohen Salzkonzentrationen wurden die NE-Vesikel in einem Extraktionspuffer aus 0.25 M STKC-Puffer und 500 mM $MgCl_2$ resuspendiert und dann sofort mit Triton X-100 1%-ig gemacht.

5.3. Untersuchung einer NE-ATPase mit S-(Dinitrophenyl)-6-Merkapto-Purinribosid-Triphosphat (TPA)

5.3.1. ATPase-Aktivitätsmessungen

Die ATPase-Aktivität wurde modifiziert nach Sikstrom et al. (103) gemessen. Dabei wurden 6.5 mg Kernprotein bzw. 3.0 mg NE-Vesikel- bzw. DNase-NE-Protein pro Test eingesetzt. Das Material wurde in 6 ml ATPase-Meßpuffer (80 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 30 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$) rehomogenisiert und in einem Doppelwandinkubationsgefäß bei 22°C gerührt. Der Test wurde durch Zugabe von 60 µl 0.3 M ATP-Lösung gestartet. Damit war die Konzentration an ATP im ATPase-Meßpuffer 3 mM. Unmittelbar nach der ATP-Zugabe und dann im Abstand von je 5 Min. wurde 1 ml aus dem Testansatz entnommen und in Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben, die 0.25 ml

50%-ige Trichloressigsäure enthielten. Dabei wurde das Enzym denaturiert und die Reaktion gestoppt. Das denaturierte Protein wurde in der Tischzentrifuge abzentrifugiert und im Überstand das durch ATP-Hydrolyse gebildete anorganische Phosphat nach Fiske und Subbarow (151) im Autoanalysator II bestimmt. Die Proteinkonzentration im Testansatz wurde in der verbleibenden Testsuspension nach Lowry (147) gemessen.

Bei den ATPase-Aktivitätstests in Anwesenheit von verschiedenen RNAs (siehe 2.6.2.2.) wurde jeder Test in einem Gesamtvolumen von nur 3 ml ATPase-Meßpuffer durchgeführt. Zu den verschiedenen Zeiten wurden je 0.6 ml entnommen und in Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben, die 0.125 ml 50%-ige Trichloressigsäure enthielten.

5.3.2. Inkubation der Kerne bzw. NE-Vesikel mit TPA

Die Kerne bzw. NE-Vesikel wurden so in 0.25 M STKMC-Puffer homogenisiert, daß die Proteinkonzentration 1 mg/ml betrug. Die Suspensionen wurden mit TPA inkubiert. Die TPA-Endkonzentration war dabei 2×10^{-5} M, die Inkubation erfolgte 30 Min. bei 35°C im Wasserbad. Die Proben wurden danach durch ein Kissen aus 5 ml 30%-igem STKMC-Puffer zentrifugiert. Die TPA-haltigen Überstände wurden verworfen und die Pellets 2 x mit 0.25 M STKMC-Puffer gewaschen und schließlich in 0.25 M STKMC-Puffer homogenisiert. Für die ATPase-Aktivitätstests wurden die Proben zentrifugiert und die Pellets in ATPase-Testpuffer aufgenommen.

5.3.3. Einschluß von TPA und Ferritin in NE-Vesikel

5.3.3.1. Einschluß von TPA

Bei den Versuchen zum Einschluß von TPA in NE-Vesikel zur Lokalisation der ATPase wurden zunächst die Zellkerne, wie unter 5.1. beschrieben, dargestellt. Die Zellkerne wurden dann so in TP-Puffer rehomogenisiert, daß die DNA-Konzen-

tration 200 µg/ml betrug. Dann wurde TPA in einer Konzentration von 2×10^{-5} M zugegeben. Unmittelbar danach erfolgte die Zugabe von Heparin und die Darstellung der NE-Vesikel. Das Pellet wurde 2 x in 0.25 M STKMC-Puffer gewaschen, in ATPase-Meßpuffer rehomogenisiert und auf eine Konzentration von 3 mg NE-Vesikelprotein pro ATPase-Aktivitätstest eingestellt. Dann wurde die ATPase-Aktivität im Vergleich zu NE-Vesikeln gemessen, die in Abwesenheit von TPA präpariert und erst nachträglich mit TPA inkubiert wurden.

5.3.3.2. Einschluß von Ferritin

Bei den Versuchen zum Einschluß von Ferritin in NE-Vesikel und dem Vergleich mit DNase-NEs wurden zunächst die Zellkerne, wie unter 5.1. beschrieben, dargestellt. Die Zellkerne wurden dann so mit ^{14}C -Ferritin inkubiert, daß die Konzentration dem 5-fachen des DNA-Gehaltes entsprach. Dann erfolgte die Präparation der DNase-NEs und der NE-Vesikel. Am Ende der Präparation wurden die Proben in 0.25 M STKMC-Puffer aufgenommen und so oft durch ein Kissen aus 30%-igem STM-Puffer bzw. 30%-igem STKMC-Puffer (30% Saccharose (wt/v), 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 25 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 3,3 mM CaCl_2) zentrifugiert, bis im Überstand keine Radioaktivität mehr meßbar war. Dann wurden die Proben erneut in 0.25 M STKMC-Puffer aufgenommen.

Bei den Versuchen zum Einschluß von Ferritin in NE-Vesikel zur elektronenmikroskopischen Darstellung wurde genauso verfahren, jedoch wurde die Ferritinkonzentration so variiert, daß sie dem 1.5-fachen bzw. 5-fachen des DNA-Gehaltes entsprach.

5.3.3.3. Bestimmung des Phosphatgehaltes der NEs

Die Bestimmung des Phosphatgehaltes erfolgte modifiziert nach Ames und Dubin (150). Die zu analysierenden Proben wurden in einen Platintiegel gegeben. Nach Zugabe von 0.1 ml

Magnesiumnitratlösung (10 gr $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ in 100 ml Ethanol) wurde so lange über einem Bunsenbrenner erhitzt, bis die Probe vollständig verascht war. Die Asche wurde in 1 ml 1 N HCl aufgenommen und der Phosphatgehalt nach Fiske und Subbarow (151) im Autoanalysator II bestimmt.

5.4. Untersuchungen im Elektronenmikroskop

5.4.1. Untersuchungen im TEM

Das zu analysierende Material wurde zunächst 3 x in 0.1 M Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen. Dann wurden die Pellets in einer Lösung aus 2.5% Glutaraldehyd in 0.1 M Soerensen-Phosphatpuffer rehomogenisiert und 1 Std. fixiert. Das fixierte Material wurde 2 x in 0.1 M Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen und dann mit einer Lösung aus 4% Osmiumtetroxid in Phosphatpuffer (pH 7.4) 2 x jeweils 30 Min. nachfixiert. Danach wurden die Proben mit Ethanol dehydratisiert. Nach Überführung in 70% Ethanol wurde eine wäßrige Agarlösung zugegeben, bis ein Agargehalt von 0.8% (wt/v) erreicht war. Die Proben wurden durch aufeinanderfolgende Behandlung mit

70% Ethanol 10 Min. 1 x

95% Ethanol 10 Min. 1 x

100% Ethanol 10 Min. 3 x

allmählich dehydratisiert und anschließend mit Propylenoxid inkubiert. Die Proben wurden über Nacht in einem 1:1 Gemisch Propylenoxid-Epon aufbewahrt und am nächsten Tag 1 Std. in reinem Epon belassen, bevor sie in Epon eingebettet wurden. Das in Epon eingebettete Material wurde am Mikrotom in Schnitte von etwa 80 nm Dicke geschnitten, die Schnitte auf einen Probenhalter überführt und mit Bleihydroxid bzw. Uranylacetat kontrastiert. Anschließend wurden die Proben im TEM (Zeiss EM 9 S II) untersucht.

5.4.2. Untersuchungen im REM

Die Vorbereitung der Proben erfolgte ebenso wie bei der Darstellung im TEM, einschließlich der Dehydratisierung durch Ethanol. Allerdings wurde hierbei kein Agar zu den Proben gegeben. Danach wurde das Ethanol gegen Isoamylacetat ausgetauscht. Die Proben wurden dann nach der Critical-Point-Methode mit flüssigem CO_2 getrocknet und anschließend mit Gold bedampft. In verschiedenen Experimenten wurde auf die Fixierung mit Osmium verzichtet, um morphologische Veränderungen auszuschließen. Die Proben wurden dann im REM (Leitz-AMR 1600 T) untersucht. Um die empfindlichen vesikulären Strukturen nicht zu zerstören, wurde hier ein Elektronenstrahl mit einer Energie von nur 5 keV verwendet.

5.5. Bestimmung des Volumens von Zellkernen und NE-Vesikeln

Zunächst wurden Zellkerne und NE-Vesikel, wie unter 5.1. und 5.2.2. beschrieben, dargestellt. Durch Resuspension in Inkubationspuffer (siehe 5.6.1.) wurde eine Proteinkonzentration von etwa 2 mg/ml eingestellt und zur Volumenmessung von jeweils 1 ml Suspension ausgegangen. Nach der Zugabe der radioaktiven Glukose (spezifische Aktivität 295 mCi/mmol, Endkonzentration 3 μM) wurden aus der Suspension 3 x 10 μl entnommen, um die Radioaktivität im Inkubationsmedium zu bestimmen. Dann wurde 15 Min. im Eisbad unter Rühren inkubiert und nach Erreichen des Äquilibriums zentrifugiert (die Zellkerne bei 2 000 x g, die NE-Vesikel bei 20 000 x g). Die Überstände wurden sehr sorgfältig entfernt und 3 x 10 μl zur Bestimmung der Radioaktivität eingesetzt. Die Pellets wurden in 10 ml Inkubationspuffer rehomogenisiert und sofort nach dem Homogenisieren 3 x 1 ml entnommen, um die Radioaktivität zu messen. Die verbleibenden Suspensionen wurden dann 20 Min. im Eisbad unter Rühren inkubiert, um einen Efflux der Glukose zu erreichen. Nach der Zentrifugation wurden von den Überständen wieder 3 x 1 ml entnommen und die Radioaktivität gemessen. Der vollständige

Efflux der Glukose wurde dadurch angezeigt, daß die Radioaktivität in diesen Überständen völlig der Radioaktivität der rehomogenisierten Suspensionen entsprach. Die Pellets wurden in 7 ml Inkubationspuffer rehomogenisiert und in 3 x 1 ml die Radioaktivität gemessen. Es wurde erneut 20 Min. im Eisbad inkubiert und nach der Zentrifugation die Radioaktivität in 3 x 1 ml Überstand gemessen. Die Werte entsprachen dem Leerwert, d.h. der Efflux war vollständig und es blieb auch keine radioaktive Glukose mit den Zellkernen bzw. NE-Vesikeln assoziiert.

Probe	Zellkerne	NE-Vesikel
A	(a) 71 600 cpm/ml	73 300 cpm/ml
	(b) 84 800 "	87 000 "
B	(a) 181 "	128 "
	(b) 141 "	180 "
C	(a) 180 "	122 "
	(b) 143 "	181 "
D	(a) 2,47 mg/ml	2.34 mg/ml
	(b) 2.08 mg/ml	2.12 mg/ml
<u>Volumen</u>	9.09 µl/mg	8.60 µl/mg

Tab.7 Meßwerte zur Bestimmung des Volumens von Zellkernen und NE-Vesikeln aus zwei Meßreihen (a) und (b).

- A = Mittelwert der Radioaktivität in 3 x 10 µl nach Zugabe der Glukose zur Kern- bzw. Vesikelsuspension;
 B = Mittelwert der Radioaktivität in 3 x 1 ml Suspension nach der ersten Zentrifugation und der Homogenisation in 10 ml Inkubationspuffer;
 C = Mittelwert der Radioaktivität in 3 x 1 ml Überstand nach der zweiten Zentrifugation;
 D = Proteinkonzentration nach Lowry (147) aus je vier Meßreihen mit je drei verschiedenen Verdünnungen.

5.6. Transportmessungen mit Proteinen an Zellkernen und NE-Vesikeln

5.6.1. Transportmessungen mittels Zentrifugalfiltration

Es wurden Polypropylen-Mikrofugenröhrchen mit einem Volumen von 400 μ l verwendet. Zuerst wurden 10 μ l HClO_4 ($d = 1.06$) in die Röhrchen pipettiert. Nach einer kurzen Zentrifugation in einer Beckman-Mikrofuge wurde die Perchlorsäure mit 40 μ l Silikonöl ($d = 1.03$) überschichtet und erneut kurz zentrifugiert. Das Silikonöl wurde durch Mischung von Silikonölen der Dichten $d = 0.91$ (Typ 3 Merck) und $d = 1.06$ (Typ 550 Merck) hergestellt.

Für die Transportmessungen mit Proteinen wurden die Zellkerne bzw. NE-Vesikel so in Inkubationspuffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 25 mM KCl, 2.5 mM MgCl_2 , 0.5 mM CaCl_2 , 5 mM NaCl, 2.5 mM Na_2HPO_4 , 5 mM Spermidin) homogenisiert, daß die Konzentration stets 2 mg/ml betrug. Die Suspensionen wurden dann im Eisbad gerührt. Von den Suspensionen wurden je 150 μ l entnommen und auf die vorbereiteten Polypropylenröhrchen geladen. Dann wurden 10 μ l der zu untersuchenden Substanz zu den Suspensionen gegeben und inkubiert. Die gewählten Inkubationszeiten lagen zwischen 5 Sekunden und 10 Stunden. Die Inkubation wurde durch den Start der Zentrifuge als beendet angesehen. Am Ende der Zentrifugation, die stets 1 Min. betrug, wurde der Überstand mit dem Silikonöl abgesaugt. Die Spitzen der Röhrchen wurden mit einem in der Flamme eines Bunsenbrenners erhitzten Skalpell oberhalb der Grenzfläche HClO_4 / Silikonöl abgeschnitten und in ein Zählgläschen mit Scinti gel (Roth) gegeben. Die Proben wurden über Nacht geschüttelt und am nächsten Tag in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (Beckman LS 3155 T) gezählt.

Für die Messungen des Austausch-Effluxes (siehe 2.5.2.4.) wurden die Suspensionen zunächst mit den radioaktiv markierten Histonen in Inkubationspuffer inkubiert. Nach dem Beladen wurden die überschüssigen Histone durch Waschen der NE-Vesikel in Inkubationspuffer entfernt und die NE-Vesikel

in einer Konzentration von 2 mg/ml rehomogenisiert. Dann wurde zu der Suspension der 10-fache Überschuß an nicht radioaktiven Histonen zugegeben und sofort die Stoppuhr eingeschaltet. Zu den Zeiten 0, 15, 30, 90, 120, 180, 240 und 300 Sekunden wurden 150 µl der Suspension entnommen und mit Hilfe einer zweiten Beckman-Mikrofuge (bedingt durch die Dauer der Zentrifugation) zentrifugiert. Anschließend wurde wie bei den Aufnahmemessungen verfahren.

5.6.2. Präparation von Histonen

Die Präparation der Histone erfolgte nach Johns (169). 100 gr Kalbsthymus wurden zerkleinert und mit 700 ml 0.9%-iger NaCl-Lösung im Starmix für etwa 2 Min. homogenisiert (höchste Schaltstufe). Danach wurde in der Sorvall-Zentrifuge 30 Min. bei 2 000 rpm im GS 3-Rotor zentrifugiert. Das Präzipitat wurde noch 5 x mit 700 ml 0.9%-iger NaCl-Lösung homogenisiert. Anschließend wurde eine zweimalige Homogenisation mit 700 ml 90%-igem Ethanol durchgeführt, wobei je 30 Sek. auf mittlerer Schaltstufe im Starmix homogenisiert und bei 2 500 rpm im GS 3-Rotor für 15 Min. zentrifugiert wurde. Zur Extraktion der beiden Histonfraktionen f2a (H2A und H4) und f3 (H3) wurde das Pellet in 400 ml eines Ethanol-1.25 N HCl (4:1 v/v)-Gemisches aufgenommen und 18 Std. in der Kältekammer auf einem Magnetrührer gerührt. Nach dem Zentrifugieren bei 2 500 rpm für 15 Min. folgte eine zweimalige Wiederholung der Extraktion mit je 200 ml Ethanol-1.25 N HCl für je 3 Std.. Die vereinigten Überstände wurden durch Glasfritten (Nr.2 und Nr.4) filtriert und gegen 1 200 ml Ethanol 18 Std. und 2 x 3 Std. dialysiert. Die dabei präzipitierte f3-Fraktion wurde bei 10 000 rpm für 15 Min. zentrifugiert, mit Ethanol und 3 x mit Aceton gewaschen (Tischzentrifuge) und im Exsikkator getrocknet. Aus dem Überstand der Zentrifugation nach der Dialyse wurde die f2a-Fraktion mit 3 Vol. Aceton gefällt, 2 x in Aceton gewaschen und ebenfalls im Exsikkator getrocknet. Das Pellet nach der Extraktion mit Ethanol-1.25 N HCl enthält die Fraktionen f2b (H2B) und f1 (H1). Diese wurden

durch Extraktion mit 1 x 300 ml 0.25 N HCl für 18 Std. und 2 x 150 ml 0.25 N HCl für je 2 Std. gewonnen. Nach der Zentrifugation bei 9 000 rpm für 30 Min. wurden die vereinigten Überstände ebenfalls durch Glasfritten filtriert. Die f1-Fraktion wurde durch sehr langsame Zugabe von 3 Vol. Aceton bei Raumtemperatur gefällt und bei 9 000 rpm im GS 3-Rotor gesammelt, 1 x mit 200 ml Aceton-0.25 N HCl (3:1 v/v) und 3 x mit Aceton gewaschen und im Exsikkator getrocknet. Die f2b-Fraktion wurde aus dem verbleibenden Überstand mit 2 Vol. Aceton gefällt, zentrifugiert, 2 x mit Aceton gewaschen und getrocknet. Die einzelnen Histonfraktionen wurden vereinigt und ihre Reinheit in der SDS-PAGE überprüft (siehe 2.5.2.1.).

Die radioaktive Markierung der Histone, aber auch von Myoglobin, Poly-Lysin, γ -Globulin und Cytochrom c, die zur Messung der Aufnahme von Nicht-Kernproteinen in NE-Vesikel eingesetzt wurden (siehe 2.5.4.), erfolgte durch ^{14}C -Acetanhydrid. Die Histone, Poly-Lysin und Cytochrom c wurden in 50 mM Tris-HCl pH 6.0, Myoglobin und γ -Globulin in 50 mM Tris-HCl pH 7.0 gelöst und auf 5 mg/ml eingestellt. Die Proben wurden dann gegen 50 mM NaHCO_3 pH 8.0 dialysiert, in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und mit ^{14}C -Acetanhydrid inkubiert. Nach der Inkubation wurde die überschüssige Radioaktivität durch Dialyse entfernt.

5.6.3. Vorinkubation der NE-Vesikel mit nicht radioaktiven Histonen; Sättigung der Histonaufnahme

Zunächst wurden NE-Vesikel, wie unter 5.2.2. beschrieben, dargestellt. Die Vesikel wurden dann so in Inkubationspuffer rehomogenisiert, daß die Proteinkonzentration 2 mg/ml betrug. Dann wurde die Suspension in 4 Fraktionen zu je 1.5 ml aufgeteilt und nicht radioaktiv markierte Histone aus einer Stammlösung von 25 mg/ml so zugegeben, daß die Histonkonzentrationen 1 mg, 5 mg bzw. 10 mg/mg Vesikelprotein betrugen. Eine Fraktion diente als Kontrolle und wurde nicht mit Histonen vorinkubiert. Mit Inkubationspuffer

wurden alle 4 Fraktionen auf das gleiche Endvolumen eingestellt. Nach einer Inkubation unter Rühren im Eisbad für 10 Min. wurde zentrifugiert, die Pellets in Inkubationspuffer gewaschen und in 1.5 ml Inkubationspuffer aufgenommen. Die Messung der Aufnahme von radioaktiv markierten Histonen erfolgte dann wie in 5.6.1. beschrieben.

Bei der Messung der Aufnahme von HMG-Proteinen, Poly-Lysin, Histon H1 und Cytochrom c nach Vorinkubation mit nicht radioaktiv markierten Histonen (siehe 2.5.3.3.) wurden die Vesikel zunächst mit Histonen in einer Konzentration von 800 µg Histonen/mg Vesikelprotein inkubiert. Die Histonkonzentration war damit 8 x höher als die normalerweise in Aufnahmemessungen eingesetzte Menge. Nach 10 Min. Inkubation unter Rühren im Eisbad wurde zentrifugiert, die Vesikel in Inkubationspuffer gewaschen und in Inkubationspuffer aufgenommen. Dann erfolgten die Aufnahmemessungen wie in 5.6.1. beschrieben.

Bei der Messung der Sättigung der Histonaufnahme wurde die Vesikelsuspension in Inkubationspuffer ebenfalls in einzelne Fraktionen unterteilt. Die radioaktiv markierten Histone wurden dann so zugegeben, daß die Konzentrationen zwischen 10 µg und 2 400 µg pro 250 µl lagen. Durch die Zugabe der Histone und des Inkubationspuffers zum Einstellen gleicher Endvolumen betrug die Vesikelkonzentration 0.4 mg pro 250 µl. Die Vesikel wurden 10 Min. im Eisbad mit den Histonen inkubiert, um maximale Aufnahme zu erreichen, anschließend zentrifugiert und die Radioaktivität in den Pellets, wie in 5.6.1. beschrieben, gemessen.

5.6.4. Präparation von HMG-Proteinen

Die Präparation der HMG-Proteine erfolgte nach Sanders (193). 300 gr Kalbsthymus wurden mit einer Schere fein zerkleinert und im Waring-Blendor mit 300 ml 1.5 M HClO_4 1 Min. bei geringer und 2 Min. bei hoher Geschwindigkeit homogenisiert.

Nach der Zentrifugation bei 2 000 x g für 30 Min. wurde das Pellet nochmals mit 150 ml 0.75 M HClO_4 homogenisiert und erneut zentrifugiert. Die vereinigten Überstände wurden durch Glasfritten (Nr.2 und Nr.4) filtriert. Dann wurden 3.5 Vol. Aceton (2 000 ml) bei 4°C zugetropft. Anschließend wurde die Lösung durch Zugabe von konzentrierter Salzsäure auf eine HCl-Konzentration von 70 mM eingestellt. Dabei fiel das Histon H1 aus und konnte durch Zentrifugation bei 2 000 x g im GS 3-Rotor für 15 Min. pelletiert werden. Das Pellet wurde 1 x mit Aceton-0.1 N HCl (3.5:1 v/v) und 3 x mit Aceton gewaschen und im Exsikkator getrocknet. Die Ausbeute an Histon H1 betrug 978 mg.

Aus dem Überstand nach der Zentrifugation von H1 wurden die HMG-Proteine durch sehr langsame Zugabe von 2.5 Vol. Aceton bei 4°C unter Rühren gefällt. Das Aceton wurde vorher auf -17°C gekühlt. Die Fällung wurde 15 Min. bei 4 000 rpm im GS 3-Rotor zentrifugiert, 3 x mit Aceton gewaschen und im Exsikkator getrocknet. Die Ausbeute betrug 124 mg.

Die Reinigung der HMG-Proteine erfolgte mittels CM-Sephadex C 25 Chromatographie unter Verwendung einer 2.3 x 17 cm messenden Säule. Die Säule wurde mit 7.5 mM Natriumboratlösung pH 9.0 äquilibriert. Die 124 mg HMG-Proteine wurden in 5 ml 7.5 mM Natriumboratlösung pH 7.0, 0.15 M NaCl unter Rühren gelöst und der Überstand einer sich anschließenden Zentrifugation bei 2 000 x g im SS 34-Rotor direkt auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit 100 ml 7.5 mM Natriumboratlösung pH 9.0, 0.15 M NaCl gespült und dann mit einem linearen Gradienten aus 500 ml 7.5 mM Natriumboratlösung pH 9.0, 0.15 M NaCl und 500 ml 7.5 mM Natriumboratlösung pH 9.0, 1 M NaCl eluiert. Es wurden Fraktionen zu je 10 ml gesammelt und die Absorptionen bei 230 nm und 280 nm gemessen. Die den HMG-Proteinen entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt, mit konz. HCl auf 0.1 M HCl eingestellt und mit 6 Vol. Aceton die Proteine gefällt. Nach der Zentrifugation bei 2 000 x g (4°C, 15 Min.) wurden die Pellets 1 x in Aceton-0.1 N HCl (6:1 v/v) und 3 x in Aceton gewaschen. Die vereinigten Pellets wurden anschließend im Exsikkator getrocknet. Die Ausbeute betrug 16.3 mg.

Die Reinheit der HMG-Proteine wurde durch SDS-PAGE überprüft (siehe 2.5.3.1.).

5.6.5. Präparation von sauren chromosomalen Proteinen

Zur Präparation der sauren chromosomalen Proteine wurden zunächst Zellkerne aus Rattenleber, wie unter 5.1. beschrieben, dargestellt. Die Isolierung des Chromatins erfolgte modifiziert nach Spelsberg und Hnilica (194). Die Zellkerne wurden 3 x in 50 Vol. (etwa 20 ml) 0.08 M NaCl, 0.02 M EDTA pH 6.3 von Hand homogenisiert und bei 5 000 x g im SS 34-Rotor in der Sorvall-Zentrifuge 10 Min. zentrifugiert. Die Pellets wurden dann 2 x in 12.5 Vol. (etwa 5 ml) 0.15 M NaCl aufgenommen, homogenisiert und wieder bei 5 000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde 2 x in 12.5 Vol. 1.5 mM NaCl, 0.15 mM Natriumcitrat pH 7.0 aufgenommen, homogenisiert und bei 20 000 x g im SS 34-Rotor 10 Min. zentrifugiert.

Die Chromatinpellets wurden dann modifiziert nach Wilson und Spelsberg (190) weiterverarbeitet, um die sauren chromosomalen Proteine zu isolieren. Sie wurden so in 0.1 mM EDTA, 2 mM Tris-HCl pH 7.5 aufgenommen, daß die DNA-Konzentration 1 mg/ml (bezogen auf den DNA-Gehalt der eingesetzten Zellkerne) betrug. Unter heftigem Rühren wurden durch Zugabe von 12 Vol. 0.4 N H_2SO_4 die Histone entfernt. Es bildete sich sofort ein weißer Niederschlag, der nach 15 Min. Rühren bei 4°C im GS 3-Rotor bei 2 000 x g zentrifugiert wurde. Der Überstand mit den darin gelösten Histonen wurde verworfen und das Pellet erneut mit 0.4 N H_2SO_4 extrahiert. Das histonfreie Chromatinpellet wurde in 8 ml 0.1 M Tris-HCl pH 7.5, 2 mM $MgCl_2$, 2 mM $CaCl_2$ homogenisiert und der pH-Wert auf 7.5 eingestellt. Zu je 1 mg DNA wurden dann 25 µg DNase I gegeben und die Suspension 60 Min. bei 30°C im Thermostat unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Durch Zugabe von 10 Vol. 0.4 N $HClO_4$ im Eisbad wurden die sauren chromosomalen Proteine gefällt, nach einer weiteren Inkubation für 10 Min. bei 4°C wurden sie im GS 3-Rotor bei 4 000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde 1 x in 0.4 N $HClO_4$ gewaschen, in 10 mM

Tris-HCl pH 8.0 aufgenommen und zur Entfernung der restlichen Perchlorsäure gegen 10 mM Tris-HCl pH 8.0 dialysiert. Anschließend wurde gegen H_2O_{dest} dialysiert und dann lyophilisiert.

5.7. PAA-Gelelektrophoresen

Die Gele wurden wie von Maizel (221) beschrieben angefertigt.

Bei den Untersuchungen der Zusammensetzung von Zellkernen und NEs (siehe 2.2.2. und 2.2.3.) wurden 10%-ige Gradientengele, bei der Präparation der Histone (siehe 2.5.2.1.), der HMG-Proteine (siehe 2.5.3.1.) und zum Nachweis der Proteine der rRNP-Fraktion (siehe 2.6.2.1.) 18%-ige Gradientengele verwendet. Auf jedes Trenngel wurde ein 5%-iges Sammelgel aufpolymerisiert. Dabei wurden mit einer Art Kamm 15 Taschen zum Auftragen der Proben vorgegeben. Die Proben wurden entweder direkt eingesetzt oder aber das Protein wurde erst mit 20%-iger Trichloressigsäure gefällt. Nach der Fällung und der anschließenden Zentrifugation wurde die Trichloressigsäure entfernt und die Proben in einem Puffer aus 20 mM Tris-HCl pH 8.8, 1% SDS, 10% Saccharose, 5 mM Merkaptoethanol und 0.1% Bromphenolblau aufgenommen. Die Proben wurden 2 Min. in ein kochendes Wasserbad gestellt, danach auf Raumtemperatur abgekühlt und auf das Gel aufgetragen. Um die Molekulargewichte der aufgetrennten Proteine schätzen zu können, wurden Proteine bekannten Molekulargewichtes zur Eichung aufgetragen:

Phosphorylase b = MG 97 400

Rinderserumalbumin = MG 68 800

Ovalbumin = MG 44 600

Trypsin-Inhibitor = MG 20 100

Die Elektrophoresen wurden in Elektrophoresepuffer (6 gr Tris-Base, 28.8 gr Glycin auf 1 Liter 0.1% SDS) bei etwa 40 mA bis zum Auslaufen des Bromphenolblaus durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele 1 Std. in Coomassie-Lösung (0.2% Coomassie-brilliant-blue, 50% Methanol,

10% Eisessig) gefärbt. Entfärbt wurden die Gele mit Entfärberlösung (50% Methanol, 10% Eisessig), wobei das Entfärberbad mehrmals gewechselt wurde. Dem letzten Entfärberbad wurden 5% Glycerin zugesetzt, um ein Brechen der Gele beim Trocknen zu verhindern.

5.8. Einfluß verschiedener RNAs auf die ATPase-Aktivität von NE-Vesikeln und DNase-NEs; Messung des Effluxes der RNAs aus den NE-Vesikeln

5.8.1. Präparation und Jodierung der verschiedenen RNAs

Bei der Präparation der verschiedenen RNAs wurden zunächst sämtliche Puffer und Zentrifugenbecher autoklaviert. Solche Puffer, die Saccharose enthielten, wurden mit Diethylpyrocarbonat behandelt, indem 50 μ l zu 100 ml Puffer gegeben wurden. Nach dem kräftigen Durchmischen bei Raumtemperatur folgte ein Erhitzen der Puffer in einem kochenden Wasserbad für 15-30 Min. Dabei zersetzte sich überschüssiges Diethylpyrocarbonat in CO_2 und Ethanol, die durch kräftiges Schütteln entfernt wurden. Dieser Vorgang wurde mehrmals wiederholt. Am Ende wurde dann nochmals der pH-Wert überprüft und gegebenenfalls eingestellt. Alle Glasgeräte wurden über Nacht im Trockenschrank bei 180°C sterilisiert.

Die Präparation von Polysomen aus Rattenleber erfolgte nach Palmiter (209):

20 gr Rattenleber wurden mit einem Skalpell sehr fein zerschnitten und in 9 Vol. eines Puffers A (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 25 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mg/ml Heparin, 2% Triton-X-100) in einem 100 ml fassenden Potter-Homogenisator zunächst schonend, dann sehr heftig homogenisiert. Das Homogenat wurde auf SS 34-Zentrifugenbecher verteilt und 5 Min. bei 27 000 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden in einem Becherglas vereinigt und das gleiche Volumen eines Puffers B (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 25 mM NaCl, 1 mg/ml Heparin, 2% Triton X-100, 200 mM MgCl_2) zugegeben, um die MgCl_2 -Konzentration auf 100 mM zu bringen. Nach einer Inkubation in

einem Eis-Kochsalz-Gemisch für 90 Min. zur Präzipitation der Ribosomen und Polysomen wurde wieder bei 27 000 x g für 10 Min. zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Polysomen-Pellets zur Isolierung von rRNA und mRNA dissoziiert.

Zur Dissoziation der Polysomen wurde die Vorschrift von Kaempfer (210) verwendet:

Die Polysomen wurden in SDS dissoziiert und dann die RNAs direkt über eine Affinitätschromatographie-Säule getrennt (207). Die Polysomen wurden in etwa 10 Vol. eines Puffers C (0.5 M NaCl, 0.5% SDS, 10 mM Tris-HCl pH 7.4) aufgenommen und dann mit Puffer C auf 50 OD_{A260}/ml eingestellt. 20 gr Leber lieferten etwa 4 000 OD_{A260}. Nach dem Erhitzen für 10 Min. bei 60°C in einem Wasserbad wurde 15 Min. bei 2 000 x g zentrifugiert, der Überstand erneut erhitzt und dann nach dem Abkühlen auf die mit Puffer C äquilibrierte Oligo(dT)-Cellulose-Säule (P.L. Biochemicals) aufgetragen. Die Säulenkapazität betrug 80-100 OD_{A260}/gr Säulenmaterial, der mRNA-Anteil an den Polysomen 1.5-2.0% (207). Deshalb wurden maximal 4 000 OD_{A260} auf die Säule aufgetragen. Nach dem Beladen der Säule wurde mit 100 ml Puffer C und anschließend mit 100 ml Puffer D (= Puffer C ohne SDS) gewaschen. Die Durchflußrate wurde mittels einer Pumpe auf 1 ml/Min., die Temperatur der Puffer mittels eines Wasserbades auf 30°C eingestellt. Nach dem Waschen mit Puffer D (bis die Absorption kleiner 0.1 OD_{A260}/ml war) wurde die mRNA mit 10 mM Tris-HCl pH 7.4 in ein Becherglas eluiert. Das Eluat wurde wieder auf 0.5 M NaCl, 0.5% SDS und 10 mM Tris-HCl pH 7.4 eingestellt und nochmals über die Säule gegeben. Hierbei wurden von den Puffern C und D nur jeweils etwa 20 ml eingesetzt. Nach dem Eluieren wurde das mRNA-Eluat mit 1 M NaCl auf 0.2 M eingestellt und durch Zugabe von 2 Vol. Ethanol bei -17°C gefällt. Am nächsten Morgen wurde die mRNA bei 25 000 x g in einem SW 27-Rotor in der Beckman-Ultrazentrifuge pelletiert, in einem möglichst kleinen Volumen (etwa 0.5 ml) H₂O_{dest} aufgenommen, die Ausbeute bei 260 nm gemessen und dann bei -70°C eingefroren. Die Säule wurde nach dem Gebrauch mit 50 ml 0.1 N NaOH und dann mit 1 M Tris-HCl pH 7.4

gewaschen und erst wieder unmittelbar vor dem nächsten Gebrauch mit Puffer C äquilibriert.

Zur Isolierung der rRNA wurden nach dem Auftragen der dissoziierten Polysomen etwa 25 ml des Vorlaufes aufgefangen. Durch Zugabe von Proteinase K in Analogie zu der Vorschrift von Hilz et al. (204) wurden im Verlauf von 20 Std. alle Polypeptide verdaut. Dann wurde 10 Min. auf 80°C erhitzt und nach dem Abkühlen mit 2 Vol. Ethanol die rRNA bei -17°C gefällt. Am nächsten Morgen wurde die rRNA zentrifugiert, in H₂O_{dest} aufgenommen und bei -70°C eingefroren.

Zur Isolierung von rRNP wurden die nach Palmiter (209) dargestellten Polysomen analog zur Vorschrift von Perry und Kelley (211) in einem Puffer aus 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 33 mM EDTA aufgenommen und ohne vorheriges Erhitzen auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit Puffer E (= Puffer D plus 33 mM EDTA) äquilibriert. Wieder wurde der Vorlauf aufgefangen (= rRNP) und mit 2 Vol. Ethanol bei -17°C gefällt. Die Pellets wurden dann in 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM NaCl aufgenommen (100 OD_{A260}/ml) und im Verlauf von 6 Std. 2 x gegen 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM NaCl dialysiert.

Abbildung 28 in Kapitel 2.6.2.1. zeigt ein Schema der Präparation der verschiedenen RNAs.

Die Jodierung von Hefe-RNA, rRNA und mRNA erfolgte exakt nach der Vorschrift von Commerford (212) unter Verwendung von ¹³¹J. Dazu wurden 3.5 mg Hefe-RNA, 3.5 mg mRNA und 4.2 mg rRNA eingesetzt. Nach der Markierung wurden die Fraktionen über eine Sephadex G 25-Säule gegeben, um überschüssiges Jod zu entfernen. In Proben der RNAs wurde die Radioaktivität gemessen, die

1.81 x 10⁶ cpm/μg für die Hefe-RNA,
1.44 x 10⁶ cpm/μg für die rRNA und
1.21 x 10⁶ cpm/μg für die mRNA betrug.

5.8.2. ATPase-Aktivitätstests in Anwesenheit von RNAs

Zur Messung des Effektes von Poly(A) (Sigma No. 8878), Hefe-RNA, rRNP, rRNA und mRNA auf die ATPase wurden zunächst DNase-NEs und NE-Vesikel, wie unter 5.2.1. und 5.2.2.

beschrieben, dargestellt. Nach dem Waschen in 0.25 M STKMC-Puffer wurden die NEs in ATPase-Meßpuffer rehomogenisiert und in einem Doppelwandinkubationsgefäß bei 22°C gerührt. Nach der Zugabe der verschiedenen RNAs in Konzentrationen von 23 µg bis 500 µg/ml wurde 10 Min. inkubiert und dann der ATPase-Test, wie unter 5.3.1. beschrieben, durchgeführt. Die Bestimmung der RNA-Konzentrationen basierte auf der Messung der Absorption bei 260 nm, wobei 1 OD_{A260} 40 µg RNA entsprechen (213). Die Poly(A)-Konzentration war durch Einwiegen von Poly(A) in ATPase-Meßpuffer gegeben.

Der Einschluß von Poly(A) in NE-Vesikel erfolgte wie der in 5.3.3.1. beschriebene Einschluß von TPA. Die eingesetzten Poly(A)-Konzentrationen waren 50 µg/ml und 600 µg/ml, und zwar bezogen auf den TP-Puffer, in dem die Zellkerne zunächst homogenisiert wurden.

5.8.3. Inkubation von Zellkernen und NE-Vesikeln mit radioaktiv markierter Hefe-RNA und mRNA

Bei diesen Versuchen wurden zunächst Zellkerne und NE-Vesikel, wie unter 5.1. und 5.2.2. beschrieben, dargestellt. Nach dem Waschen in 0.25 M STKMC-Puffer wurden diese in ATPase-Meßpuffer aufgenommen und auf eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml eingestellt. Dann wurden die Zellkerne und die NE-Vesikel in je 4 Fraktionen zu 1 ml aufgeteilt. Nach der Zugabe von 50 µg markierter Hefe-RNA bzw. mRNA wurde bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Messung des ATP-Effektes wurde sofort nach der Zugabe der RNA die ATP-Konzentration auf 3 mM eingestellt. Zu den Zeiten 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 und 30 Min. wurden 100 µl der Suspensionen entnommen und in der Beckman-Mikrofuge, wie in 5.6.1. dargestellt, zentrifugiert und die Radioaktivität in den Pellets gemessen.

5.8.4. Einschluß von Hefe-RNA, rRNA und mRNA in NE-Vesikel

Die jodierten RNAs wurden, wie unter 5.3.3.1. für TPA beschrieben, in die Vesikel eingeschlossen. Dabei wurden 40 µg

Hefe-RNA (7.24×10^7 cpm), 40 μ g rRNA (5.76×10^7 cpm) und 40 μ g mRNA (4.84×10^7 cpm) pro ml TP-Puffer zugegeben. Nach der Zentrifugation bei 45 000 x g, die in diesen Fällen auf 10 Min. reduziert wurde, wurden die Vesikel in einem auf -3°C gekühlten Transportpuffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 30 mM KCl, 3 mM MgCl_2) aufgenommen. Nach zweimaligem Waschen wurden die Vesikel in auf Raumtemperatur eingestellten Transportpuffer aufgenommen und eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml eingestellt. Die Suspensionen wurden dann in 2 bzw. 3 Fraktionen aufgeteilt. Nach der Zugabe von ATP bzw. ADP (Endkonzentration 2 mM) wurde die Stoppuhr gestartet und der Efflux gemessen, indem zu den Zeiten 1, 3, 5, 10, 20 und 30 Min. je 150 μ l entnommen und auf Polypropylenröhrchen geladen wurden. Die Polypropylenröhrchen wurden vorher, wie in 5.6.1. beschrieben, mit Perchlorsäure und Silikonöl beladen. Nach der Zentrifugation wurden vom Überstand 130 μ l entnommen, über Nacht in einem Zählgläschen mit Scinti gel geschüttelt und am nächsten Tag die Radioaktivität gemessen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Gerace L., Blum A., Blobel G. (1978)
J.Cell Biol. 79, 546-566
2. Afzelius B.A. (1955)
Exp.Cell Res. 8, 147-158
3. Richardson J.C.W., Maddy A.H. (1980)
J.Cell Sci. 43, 269-277
4. Kondor-Koch C. (1980)
Dissertation, Universität Frankfurt
5. Franke W.W. (1977)
Biochem.Soc.Symp. 42, 125-135
6. Osborn M., Weber K. (1977)
Exp.Cell Res. 106, 339-349
7. Lehto V.-P., Virtanen I., Kurki P. (1978)
Nature 272, 175-177
8. Fawcett D.W. (1966)
Am.J.Anat. 119, 129-146
9. Aaronson R.P., Blobel G. (1975)
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 72, 1007-1011
10. Shelton K.R., Egle P.M., Cochran D.L. (1981)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 103, 975-981
11. Aaronson R.P., Blobel G. (1974)
J.Cell Biol. 62, 746-754
12. Jackson R.C. (1976)
Biochemistry 15, 5641-5651
13. Shelton K.R., Cobbs C., Povlishock J., Burkat R. (1976)
Arch.Biochem.Biophys. 174, 177-186
14. Shelton K.R., Egle P.M. (1979)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 90, 425-430
15. Shelton K.R., Higgins L.L., Cochran D.L., Ruffolo J.J.,
Egle P.M. (1980)
J.Biol.Chem. 255, 10978-10983
16. Krohne G., Franke W.W., Scheer U. (1978)
Exp.Cell Res. 116, 85-102
17. Kaufmann S.H., Gibson W., Shaper J.H. (1983)
J.Biol.Chem. 258, 2710-2719

18. Maul G.G., Avdalovic N. (1980)
Exp.Cell Res. 130, 229-240
19. Lam K., Kasper C. (1979)
J.Biol.Chem. 254, 11713-11720
20. Shelton K.R., Guthrie V.H., Cochran D.L. (1982)
J.Biol.Chem. 257, 4328-4332
21. Detke S., Keller J.M. (1982)
J.Biol.Chem. 257, 3905-3911
22. Gerace L., Blobel G. (1980)
Cell 19, 277-287
23. Conner G.E., Noonan N.E., Noonan K.D. (1980)
Biochemistry 19, 279-289
24. Franke W.W., Deumling B., Zentgraf H., Falk H.,
Rae P.M.M. (1973)
Exp.Cell Res. 81, 365-392
25. Zbarsky I.B. (1978)
Int.Rev.Cytol. 54, 295-363
26. Schatten G., Thomas M. (1978)
J.Cell Biol. 77, 517-535
27. Franke W.W., Scheer U., Krohne G., Jarasch E.D. (1981)
J.Cell Biol. 91, 39s-50s
28. Fais D., Prusov A.N., Polyakov V.Yu. (1982)
Cell Biology Int.Rep. 6, 433-441
29. Harris J.R. (1978)
Biochim.Biophys.Acta 515, 55-104
30. Zatsepina O.V., Polyakov V.Yu., Chentsov Yu.S. (1982)
Europ.J.Cell Biol. 26, 277-283
31. Turner W.A., Tchen T.T., Taylor J.D. (1982)
Exp.Cell Res. 140, 267-273
32. Berezney R., Coffey D.S. (1974)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 60, 1410-1417
33. Kaufmann S.H., Coffey D.S., Shaper J.H. (1981)
Exp.Cell Res. 132, 105-123
34. Comings D.E., Okada T.A. (1976)
Exp.Cell Res. 103, 341-360
35. Berezney R., Buchholtz L.A. (1981)
Biochemistry 20, 4995-5002

36. Kornberg R.D. (1977)
Ann.Rev.Biochem. 46, 931-954
37. McGhee J.D., Felsenfeld G. (1980)
Ann.Rev.Biochem. 49, 1115-1156
38. Cook P.R., Brazell I.A. (1975)
J.Cell Sci. 19, 261-279
39. Benyajati C., Worcel A. (1976)
Cell 9, 393-407
40. Pinon R., Salts Y. (1977)
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74, 2850-2854
41. Berezney R., Coffey D.S. (1975)
Science 189, 291-293
42. Dijkwel P.A., Mullenders L.H.F., Wanka K. (1979)
Nucleic Acids Res. 6, 219-230
43. Pardoll D.M., Vogelstein B., Coffey D.S. (1980)
Cell 19, 527-536
44. Berezney R., Buchholtz L.A. (1981)
Exp.Cell Res. 132, 1-13
45. Valenzuela M.S., Mueller G.C., Dasgupta S. (1983)
Nucleic Acids Res. 11, 2155-2164
46. Smith H.C., Berezney R. (1980)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 97, 1541-1547
47. Smith H.C., Berezney R. (1982)
Biochemistry 21, 6751-6761
48. Pardoll D.M., Vogelstein B. (1980)
Exp.Cell Res. 128, 466-470
49. Basler J., Hastie N.D., Pietras D., Matsui S-I.,
Sandberg A.A., Berezney R. (1981)
Biochemistry 20, 6921-6929
50. Small D., Nelkin B., Vogelstein B. (1982)
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 79, 5911-5915
51. Robinson S.I., Nelkin B., Vogelstein B. (1982)
Cell 28, 99-106
52. Herman R., Weymouth L., Penman S. (1978)
J.Cell Biol. 78, 663-674
53. Miller T.E., Huang C-Y., Pogo A.O. (1978)
J.Cell Biol. 76, 675-691

54. Ross D.A., Yen R.-W., Chae C.-B. (1982)
Biochemistry 21, 764-771
55. Mariman E.C.M., Eekelen C.A.G.v., Reinders R.J.,
Berns A.J.M., Venrooij W.J.v. (1982)
J.Mol.Biol. 154, 103-119
56. Mariman E., Hagebols A.-M., Venrooij W.J.v. (1982)
Nucleic Acids Res. 10, 6131-6145
57. Ciejek E.M., Nordstrom J.L., Tsai M.-J.,
O'Malley B.W. (1982)
Biochemistry 21, 4945-4953
58. Unwin P.N.T., Milligan R.A. (1982)
J.Cell Biol. 93, 63-75
59. Franke W.W. (1974)
Int.Rev.Cytol. 4 (Suppl.), 71-236
60. Green N.M. (1982)
Nature 297, 287-288
61. Stick R., Krohne G. (1982)
Exp.Cell Res. 138, 319-330
62. Gerace L., Ottaviano Y., Kondor-Koch C. (1982)
J.Cell Biol. 95, 826-837
63. Feldherr C.M. (1965)
J.Cell Biol. 25, 43-51
64. Paine P.L., Feldherr C.M. (1972)
Exp.Cell Res. 74, 81-98
65. Bonner W.M. (1975)
J.Cell Biol. 64, 421-430
66. Paine P.L., Moore L.C., Horowitz S.B. (1975)
Nature 254, 109-114
67. Paine P.L. (1975)
J.Cell Biol. 66, 652-657
68. Horowitz S.B. (1972)
J.Cell Biol. 54, 609-625
69. Paine P.L., Pearson T.W., Tluczek L.J.M.,
Horowitz S.B. (1981)
Nature 291, 258-261
70. Gurdon J.B. (1970)
Proc.Roy.Soc.Lond.B 176, 303-314

71. Bolla R., Roth H.E., Weissbach H., Brot N. (1977)
J.Biol.Chem. 252, 721-725
72. Feldherr C.M., Cohen R.J., Ogburn J.A. (1983)
J.Cell Biol. 96, 1486-1490
73. Dingwall C.S., Sharnick V., Laskey R.A. (1982)
Cell 30, 449-458
74. Dabauvalle M-C., Franke W.W. (1982)
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 79, 5302-5306
75. Bonner W.M. (1975)
J.Cell Biol. 64, 431-437
76. De Robertis E.M., Longthorne R.F., Gurdon J.B. (1978)
Nature 272, 254-256
77. Sanger J.W., Sanger J.M., Kreis T.E.,
Jockusch B.M. (1980)
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77, 5268-5272
78. Mills A.D., Laskey R.A., Black P.,
De Robertis E.M. (1980)
J.Mol.Biol. 139, 561-568
79. Goldstein L., Ko C. (1981)
J.Cell Biol. 88, 516-525
80. Mills K.I., Bell L.G.E. (1981)
Exp.Cell Res. 136, 469-473
81. Mills K.I., Bell L.G.E. (1982)
Exp.Cell Res. 142, 207-213
82. Jeter J.R., Cameron I.L., Hart N.E., Rusch H.P. (1982)
Exp.Cell Res. 138, 474-480
83. Sabatini D.D., Kreibich G., Morimoto T.,
Adesnik M. (1982)
J.Cell Biol. 92, 1-22
84. Feldherr C.M. (1975)
Exp.Cell Res. 93, 411-419
85. Siebert G. (1972)
Sub-Cell.Biochem. 1, 277-292
86. Yamaizumi M., Uchida T., Okada Y., Furusawa M.,
Mitsui H. (1978)
Nature 273, 782-784
87. Rechsteiner M., Kuehl L. (1979)
Cell 16, 901-908

88. Feldherr C.M., Pomerantz J. (1978)
J.Cell Biol. 78, 168-175
89. Goldstein L. (1976)
Nature 261, 519-521
90. Benecke B.-J., Penman S. (1977)
Cell 12, 939-946
91. Goldstein L., Wise G.E., Ko C. (1977)
J.Cell Biol. 73, 322-331
92. Paine P.L., Horowitz S.B. (1980)
in Cell Biology: A Comprehensive Treatise Vol. 4, 299-338
(eds. Goldstein L. and Prescott D.M., Academic N.Y.)
93. Adams J.M., Cory S. (1975)
Nature 255, 28-33
94. Molloy G.R., Sporn M.B., Kelley D.E., Perry R.P. (1972)
Biochemistry 11, 3256-3260
95. Blobel G. (1973)
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 70, 924-928
96. Clawson G.A., Smuckler E.A. (1982)
J.theor.Biol. 95, 607-613
97. Agutter P.S., McArdle H.J., McCaldin B. (1976)
Nature 263, 165-167
98. Agutter P.S., Harris J.R., Stevenson I. (1977)
Biochem.J. 162, 671-679
99. Agutter P.S., Cockrill J.B., Lavine J.E., McCaldin B.,
Sim R.B. (1979)
Biochem.J. 181, 647-658
100. Clawson G.A., James J., Woo C.H., Friend D.S.
Moody D., Smuckler E.A. (1980)
Biochemistry 19, 2748-2756
101. Klein R.L., Afzelius B.A. (1966)
Nature 212, 609
102. Yasuzumi G., Tsubo I., Okada A., Terawaki A.,
Enomoto Y. (1968)
J.Ultrastruct.Res. 23, 321-332
103. Sikstrom R., Lanoix J., Bergeron J.J.M. (1976)
Biochim.Biophys.Acta 448, 88-102
104. Ishikawa K., Sato-Odani S., Ogata K. (1978)
Biochim.Biophys.Acta 521, 650-661

105. Baglia F.A., Maul G.G. (1983)
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80, 2285-2289
106. Kondor-Koch C., Riedel N., Valentin R., Fasold H.,
Fischer H. (1982)
Europ.J.Biochem. 127, 285-289
107. Berrios M., Blobel G., Fisher P.A. (1983)
J.Biol.Chem. 258, 4548-4555
108. Bernd A., Schröder H.C., Zahn R.K., Müller W.E.G. (1982)
Europ.J.Biochem. 129, 43-49
109. Schumm D.E., Webb T.E. (1975)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 67, 706-713
110. Kletzien R.F. (1980)
Biochem.J. 192, 753-759
111. Palayoor T., Schumm D.E., Webb T.E. (1981)
Biochim.Biophys.Acta 654, 201-210
112. Stuart S.E., Clawson G.A., Rottman F.M.,
Patterson R.J. (1977)
J.Cell Biol. 72, 57-66
113. Herlan G., Giese G., Wunderlich F. (1980)
Biochemistry 19, 3960-3966
114. Jacobs H., Birnie G.D. (1982)
Europ.J.Biochem. 121, 597-607
115. Agutter P.S. (1980)
Biochem.J. 188, 91-97
116. Müller W.E.G., Bernd A., Schröder H.C. (1983)
Europ.J.Biochem., im Druck
117. Agutter P.S., Suckling K.E. (1982)
Biochim.Biophys.Acta 696, 308-314
118. Feldherr C.M. (1980)
Cell Tissue Res. 205, 157-162
119. Patterson R.J., Lysterly M., Stuart S.E. (1981)
Cell Biology Int.Rep. 5, 27-36
120. Giese G., Wunderlich F. (1982)
J.Biol.Chem. 258, 131-135
121. Wunderlich F., Giese G., Falk H. (1983)
Mol.Cell.Biol. 3, 693-698

122. Murty C.N., Verney E., Sidransky H. (1982)
in The Nuclear Envelope and the Nuclear Matrix,
The Wistar Symposium Series, ed Maul G.G. (Liss, N.Y.)
Vol. 2, 111-127
123. Moffet R.B., Webb T.E. (1981)
Biochemistry 20, 3253-3262
124. Vigneri R., Goldfine I.D., Wong K.Y., Smith G.J.,
Pezzino V. (1978)
J.Biol.Chem. 253, 2098-2103
125. Purrello F., Vigneri R., Clawson G.A.,
Goldfine I.D. (1982)
Science 216, 1005-1006
126. Schumm D.E., Webb T.E. (1981)
Arch.Biochem.Biophys. 210, 275-279
127. Agutter P.S., Suckling K.E. (1982)
Biochim.Biophys.Acta 698, 223-229
128. Schumm D.E., Webb T.E. (1982)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 105, 375-382
129. Blobel G., Potter V.R. (1966)
Science 154, 1662-1665
130. Shires T.K. (1982)
Biochem.J. 205, 321-329
131. Wang M-L.J., Friedman D.L. (1982)
Biochim.Biophys.Acta 697, 41-52
132. Spiker S., Murray M.G., Thompson W.F. (1983)
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80, 815-819
133. Morris G.F., Marzluff W.F. (1983)
Biochemistry 22, 645-653
134. Landes G.M., Martinson H.G. (1982)
J.Biol.Chem. 257, 11002-11007
135. Lohr D., Ide G.I. (1983)
J.Biol.Chem. 258, 4668-4671
136. Manley J.L., Sharp P.A., Gefter M.L. (1982)
J.Mol.Biol. 159, 581-599
137. Monneron A., Blobel G., Palade G.E. (1972)
J.Cell Biol. 55, 104-125
138. Harris J.R., Milne J.F. (1974)
Biochem.Soc.Trans. 2, 1251-1253

139. Kay R.R., Fraser D., Johnston J.R. (1972)
Europ.J.Biochem. 30, 145-154
140. Bornens M., Courvalin J.C. (1978)
J.Cell Biol. 76, 191-206
141. Shelton K.R. (1976)
Biochim.Biophys.Acta 455, 973-982
142. Dwyer N., Blobel G. (1976)
J.Cell Biol. 70, 581-591
143. Blobel G., persönliche Mitteilung
144. Courvalin J.C., Dumontier M., Bornens M. (1982)
J.Biol.Chem. 257, 456-463
145. Burton K. (1956)
Biochem.J. 62, 315-322
146. Dische Z. (1930)
Mikrochemie 8, 4-32
147. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L.,
Randall R.J. (1951)
J.Biol.Chem. 193, 265-275
148. Aaronson R.P., Coruzzi L.A., Schmidt K. (1982)
in The Nuclear Envelope and the Nuclear Matrix,
The Wistar Symposium Series, ed Maul G.G. (Liss, N.Y.)
Vol. 2, 13-29
149. Agutter P.S., Gleed C.D. (1980)
Biochem.J. 192, 85-89
150. Ames B.N., Dubin D.T. (1960)
J.Biol.Chem. 235, 769-775
151. Fiske C.H., Subbarow Y. (1925)
J.Biol.Chem. 66, 375
152. Kletzien R.F., Pariza M.W., Becker J.E.,
Potter V.R. (1975)
Anal.Biochem. 68, 537-544
153. Kirschner R.H., Rusli M., Martin T.E. (1977)
J.Cell Biol. 72, 118-132
154. Dalmark M., Wieth J.O. (1972)
J.Physiol. 224, 583-610
155. Klingenberg M., Pfaff E. (1967)
in Methods in Enzymology 10, 680
(eds. Colowick J.P. and Kaplan N.O., Acad.Press N.Y.)

156. Wang J.C. (1982)
Cell 29, 724-726
157. Grimes S.R., Henderson N. (1983)
Arch.Biochem.Biophys. 221, 108-116
158. Waterborg J.H., Matthews H.R. (1983)
Biochemistry 22, 1489-1496
159. Langhan T.A. (1982)
J.Biol.Chem. 257, 14835-14846
160. Hohmann P.G., He D-X., Shows T.B. (1983)
Exp.Cell Res. 143, 207-216
161. Levy-Wilson B. (1983)
Biochemistry 22, 484-489
162. Hilz H. (1981)
Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 362, 1415-1425
163. Wong M., Miwa M., Sugimura T., Smulson M. (1983)
Biochemistry 22, 2384-2389
164. Goldknopf I.L., Busch H. (1977)
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74, 5492-5495
165. Gurley R.L., D'Anne J.A., Barkham S.S., Deaven L.L.,
Tobey R.A. (1978)
Europ.J.Biochem. 84, 1-15
166. Annunziato A.T., Schindler R.K., Riggs M.G.,
Seale R.L. (1982)
J.Biol.Chem. 257, 8507-8515
167. Jackson V., Chalkley R. (1981)
J.Biol.Chem. 256, 5095-5103
168. Russev G., Hancock R. (1982)
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 79, 3143-3147
169. Johns E.W. (1964)
Biochem.J. 92, 55-59
170. Elgin S.C.R., Weintraub H. (1975)
Ann.Rev.Biochem. 44, 725-774
171. Cox G.S. (1982)
J.Cell Sci. 58, 363-384
172. Prasad R., Shopsis C., Hochstadt J. (1981)
Biochim.Biophys.Acta 643, 306-318
173. Ohsumi Y., Anraku Y. (1981)
J.Biol.Chem. 256, 2079-2082

174. Bendtzen K., Rocklin R.E. (1980)
J.Immunol. 125, 1775-1781
175. Pipkin J.L., Hinson W.G., Hudson J.L., Anson J.,
Pack L.D. (1981)
Biochim.Biophys.Acta 655, 421-431
176. Rabbani A., Goodwin G.H., Johns E.W. (1978)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 81, 351-358
177. Reeves R., Chang D. (1983)
J.Biol.Chem. 258, 679-687
178. Bassuk J.A., Mayfield J.E. (1982)
Biochemistry 21, 1024-1027
179. Weisbrod S.T. (1982)
Nucleic Acids Res. 10, 2017-2042
180. Goodwin G.H., Johns E.W. (1978)
Biochim.Biophys.Acta 519, 279-284
181. Mardian J.K.W., Paton A.E., Bunick G.J.,
Olins D.E. (1980)
Science 209, 1534-1536
182. Uberbacher E.C., Mardian J.K.W., Rossi R.M., Olins D.E.,
Bunick G.J. (1982)
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 79, 5258-5262
183. Boffa L.C., Sterner R., Vidali G., Allfrey V.G. (1979)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 89, 1322-1327
184. Sterner R., Vidali G., Heinrikson R.L.,
Allfrey V.G. (1978)
J.Biol.Chem. 253, 7601-7604
185. Bhorjee J.S. (1981)
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78, 6944-6948
186. Paulson J.R., Taylor S.S. (1982)
J.Biol.Chem. 257, 6064-6072
187. Palvimo J., Linnala-Kankkunen A., Mäenpää A. (1983)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 110, 378-382
188. Tanuma S., Johnson G.S. (1983)
J.Biol.Chem. 258, 4067-4070
189. Reeves R., Chang D., Chung S-C. (1981)
Proc.Natl.Acad.Sci. 78, 6704-6708

190. Wilson E.M., Spelsberg T.C. (1975)
in Methods in Enzymology 40, 171-176
(eds. Colowick S.P. and Kaplan N.O., Acad.Press N.Y.)
191. Stein G., Baserga R. (1971)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 44, 218-223
192. Spelsberg T.C., Steggles A.W., O'Malley B.W. (1971)
J.Biol.Chem. 246, 4188-4197
193. Sanders C. (1977)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 78, 1034-1042
194. Spelsberg T.C., Hnilica L.S. (1971)
Biochim.Biophys.Acta 228, 202-211
195. Tatchell K., Van Holde K.E. (1979)
Biochemistry 18, 2871-2880
196. Panyim S., Bilek D., Chalkley R. (1971)
J.Biol.Chem. 246, 4206-4215
197. Mayrand S., Setyono B., Greenberg J.R.,
Pederson T. (1981)
J.Cell Biol. 90, 380-384
198. Valentin R. (1982)
Dissertation, Universität Frankfurt
199. Agutter P.S., Ramsay I. (1979)
Biochem.Soc.Trans. 7, 720-721
200. McDonald J., Agutter P.S. (1980)
FEBS Letters 116, 145-148
201. Chirgwin J.M., Przybyla A.E., MacDonald R.J.,
Rutter W.J. (1979)
Biochemistry 18, 5294-5299
202. Roth J.S. (1956)
Biochim.Biophys.Acta 21, 34-43
203. Blobel G., Potter V.R. (1967)
J.Mol.Biol. 28, 539-542
204. Hilz H., Wiegers U., Adamietz P. (1975)
Europ.J.Biochem. 56, 103-108
205. Lee S.Y., Mendecki J., Brawerman G. (1971)
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 68, 1331-1335
206. Aviv H., Leder P. (1972)
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 69, 1408-1412

207. Krystosek A., Cawthon M.L., Kabat D. (1975)
J.Biol.Chem. 250, 6077-6084
208. Berger S.L., Wallace D.M., Siegal G.P.,
Hitchcock M.J.M., Birkenmeier C.S., Reber S.B. (1981)
in Methods in Enzymology 79, 59-68
(eds. Colowick J.P. and Kaplan N.O., Acad.Press N.Y.)
209. Palmiter R.D. (1974)
Biochemistry 13, 3606-3615
210. Kaempfer R. (1979)
in Methods in Enzymology LX, 380-392
(eds. Colowick J.P. and Kaplan N.O., Acad.Press N.Y.)
211. Perry R.P., Kelley D.E. (1968)
J.Mol.Biol. 35, 37-59
212. Commerford S.L. (1971)
Biochemistry 10, 1993-1999
213. Kabat D. (1975)
J.Biol.Chem. 250, 6085-6092
214. Clawson G.A., Koplitiz M., Castler-Schechter B.,
Smuckler E.A. (1978)
Biochemistry 17, 3747-3752
215. Agutter P.S. (1982)
in The Nuclear Envelope and the Nuclear Matrix,
The Wistar Symposium Series, ed Maul G.G. (Liss, N.Y.)
Vol. 2, 91-109
216. Bachmann M., Bernd A., Schröder H.C., Zahn R.K.,
Müller W.E.G. (1983)
Europ.J.Biochem., im Druck
217. Hill T.L. (1969)
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 69, 267-274
218. Nemer M., Dubroff L.M., Graham M. (1975)
Cell 6, 171-178
219. Hinterberger M., Petterson I., Steitz J.A. (1983)
J.Biol.Chem. 258, 2604-2613
220. Clawson G.A., Smuckler E.A. (1978)
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75, 5400-5404
221. Maizel J.V. (1969)
Acrylamide gelelectrophoresis of proteins and nucleic
acids in: Fundamental Techniques in Virology pp. 334-362
(eds. Habel K. and Salzman N.P., Acad. Press N.Y.)

Meine akademischen Lehrer waren die Professoren

Dr. A. Fadini, Dr. H.U. Koecke, Dr. W. Nultsch, Dr. D. Reinen,
Dr. R. Remane, Dr. K.A. Seitz und Dr. Wassmuth in Marburg,

Dr. H. Becht, Dr. K. Brändle, Dr. M. Brendel, Dr. T. Butterfass,
Dr. A. Doiwa, Dr. Dr. H. Fasold, Dr. W. Gross, Dr. G. Heldmaier,
Dr. W. Hilgenberg, Dr. H-J. Hohorst, Dr. W. Ilse, Dr. H-M.
Jahns, Dr. K-H. König, Dr. A. Kranz, Dr. R. Lotz, Dr. H-D.
Mennigmann, Dr. Müser, Dr. Dr. E. Mutschler, Dr. G. Neuweiler,
Dr. F. Pons, Dr. H-J. Rhaese, Dr. A. Ried, Dr. P. Rosenmund,
Dr. G. Rosenstock, Dr. H. Rüterjans, Dr. M.W. Schäfer, Dr. H.
Schaub, Dr. H. Schmidt, Dr. D. Schubert, Dr. G. Siefert,
Dr. H. Steiger, Dr. D. Steinbach, Dr. Dr. H-J. Teuber, Dr. H.
TomDieck, Dr. F. Wächter, Dr. K.H. Wallhäusser, Dr. G. Werner,
Dr. C. Winter und Dr. C. Woenckhaus in Frankfurt.

Lebenslauf

23.10.1957	geboren als Sohn des technischen Kaufmanns Robert Riedel und seiner Ehefrau Gisela, geb. Geuter in Bremervörde
1.4.1964-Juli 1967	Besuch der Volksschule in Trier-Heiligkreuz
23.8.1967-4.6.1976	Besuch des Staatl. Max-Planck-Gymnasiums in Trier
4.6.1976	Ablegen der Reifeprüfung
1.10.1976-31.3.1977	Biologiestudium an der Philipps-Universität in Marburg
1.4.1977-18.8.1980	Biologiestudium an der J.W.Goethe-Universität in Frankfurt/Main mit Ablegen folgender Prüfungen:
26.9.1978	Diplom-Vorprüfung
18.8.1980	Diplom-Hauptprüfung in den Fächern Biochemie, Pharmakologie und Mikrobiologie
Okt. 1980-Sept. 1981	Diplomarbeit am Institut für Biochemie der Universität Frankfurt/M
Seit Sept. 1981	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biochemie der Universität Frankfurt/M
2.10.1981	Eheschließung mit der kaufmännischen Angestellten Ursula Kurpiers.

Kongreßmitteilungen und Veröffentlichungen

1. N. Riedel and H. Fasold
Outside Out and Closed Vesicles from Rat Liver
Nuclear Membranes.
Réunion Commune Soc. Chim. Biol. France-Allemagne,
Strasbourg, 1981
2. N. Riedel and H. Fasold
Uptake and Exchange Kinetics of Different Proteins
by Double-Membrane Vesicles from Rat Liver Nuclear
Membranes; Distribution of the Proteins; Effect of
Nucleotides.
International Summer School, Spetsai/Greece 1982
3. Kondor-Koch C., Riedel N., Valentin R., Fasold H.,
Fischer H. (1982)
Characterization of an ATPase on the Inside of Rat
Liver Nuclear Envelopes by Affinity Labeling
Europ.J.Biochem. 127, 285-289
4. N. Riedel and H. Fasold
Transport Phenomena in Rat Liver Nuclear Membranes.
Symposium on Cytoskeleton and Membrane Functions,
Frankfurt 1983
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. (im Druck)
5. N. Riedel, M. Bachmann and H. Fasold
Transport of Proteins, mRNAs and mRNPs by Vesicles
from Rat Liver Nuclear Membranes.
15th Meeting of the Federation of European Biochemical
Societies, Brussels 1983
6. N. Riedel, M. Bachmann and H. Fasold
Effect of Various Nucleic Acids on an ATPase on the
Inside of Rat Liver Nuclear Membranes.
Herbsttagung der GBCh, Göttingen 1983
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. (im Druck)

